



THESE

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} décembre 2005 par

JULIEN VALTON

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

Spécialité : **BIOLOGIE STRUCTURALE ET NANOBIOLOGIE**

Réaction d'hydroxylation aromatique catalysée par une hydroxylase flavine-dépendante à deux composants : le système ActVA-ActVB de *Streptomyces coelicolor*

COMPOSITION DU JURY

Président	Dr. Michel Satre
Rapporteurs	Dr. Mariella Tegoni Prof. Guy Branlant
Directeur	Dr. Vincent Nivière
Co-directeur	Prof. Marc Fontecave

Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques
UMR 5047-CEA-CNRS-Université Joseph Fourier
CEA-Grenoble, DRDC/CB

Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques dirigé par le professeur Marc Fontecave, au CEA Grenoble. Je tiens à le remercier profondément pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et encadré durant ces trois années de thèse.

Le Dr. Vincent Nivière mérite tout autant ma reconnaissance et mes remerciements pour la compétence et la rigueur scientifique avec lesquelles il a encadré ce travail. Merci à toi Vince, pour la patience dont tu as fait preuve durant ces quatre années.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements à Mariella Tegoni, Guy Branlant et Michel Satre pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse enfin de chaleureux remerciements à tous les membres du laboratoire pour le soutien et la sympathie qu'ils m'ont apportés.

Da	: dalton
DHK	: dihydrokalafungine
DHK-OH	: dihydrokalafungine hydroxylée
E'^0	: potentiel rédox standard
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
ϵ	: coefficient d'extinction molaire
FAD	: flavine adénine dinucléotide
$Fl_{red / ox}$: flavine réduite / oxydée
FlH°	: flavine semiquinone
$FMN_{red / ox}$: flavine mononucléotide réduite / oxydée
FMNOOH	: c(4a)-hydroperoxyflavine
FNR/FdI	: flavodoxine/flavodoxine réductase
H_2O_2	: peroxyde d'hydrogène
IPTG	: isopropylthiogalactoside
I_F	: intensité de fluorescence
kDa	: kilodalton
K_d	: constante d'équilibre de dissociation
LB	: milieu Luria-Bertani
λ	: longueur d'onde
mV	: millivolt
NAD / NADH	: nicotinamide adénine dinucléotide oxydé / réduit
$NADP^+ / NADPH$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé / réduit
$NNM-A_{red / ox}$: nanaomycine A réduite / oxydée
$NNM-D_{red / ox}$: nanaomycine D réduite / oxydée
NTA	: nitrilo tétra-acétate
$O_2^{\cdot-}$: superoxyde
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PHBH	: para-hydroxybenzoate hydroxylase
SDS	: sodium dodecyl sulfate
TAE	: tampon 40 mM Tris-acétate pH 8, 1 mM EDTA
TC-FDM	: two-components flavin-diffusible monooxygenases
Tris	: tris-hydroxyméthyl-aminométhane
UV	: ultra-violet

I L'oxygène

L'oxygène moléculaire est un élément essentiel à l'existence des organismes aérophiles. Il joue un rôle central dans la respiration cellulaire et il est également impliqué dans la biosynthèse et la dégradation d'un grand nombre de molécules. Dans tous ces processus, l'oxygène sert d'agent oxydant et il est le plus souvent réduit à 2, voire à 4 électrons.

Bien que ces réactions sont thermodynamiquement très favorables ($E^\circ[\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2] = +281 \text{ mV}$, $E^\circ[\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2] = +815 \text{ mV}$), d'un point de vue cinétique elles sont fortement limitées. Ceci est dû à la configuration électronique particulière de l'oxygène moléculaire qui, dans son état fondamental, possède deux électrons non appariés. Cet état de spin, nommé état triplet, empêche l'oxygène de réagir efficacement avec la plupart des molécules organiques qui, dans la majorité des cas, ne possèdent pas d'électron non apparié (état singulet) (Hamilton, 1974). La loi de conservation de spin indique en effet que l'oxygène doit être préalablement converti en état singulet avant de pouvoir réagir avec ce type de molécules (Hamilton, 1974; Taube, 1965). Cette conversion, nommée inversion de spin, est limitée par une barrière d'activation importante qui ne peut être franchie qu'en présence d'un catalyseur. L'oxygène moléculaire, inerte dans son état fondamental, doit donc être activé afin d'exprimer ses propriétés oxydantes au sein de la cellule.

D'une façon générale, l'activation de l'oxygène s'effectue par des processus de réduction. C'est ce qu'il se passe lorsque l'oxygène est utilisé par les hydroxylases ou les monooxygénases, des enzymes qui catalysent l'introduction d'un ou plusieurs atomes d'oxygène au sein des molécules organiques. Ces réactions d'hydroxylation occupent une place centrale dans de nombreuses voies de biosynthèse et de biodégradation et sont le plus souvent essentielles à la vie des organismes aérophiles.

Les hydroxylases et monooxygénases peuvent être regroupées dans deux grandes classes en fonction de la structure de leur site actif et de la nature du cofacteur qu'elles utilisent pour activer l'oxygène.

La première classe regroupe des enzymes à cofacteur métallique. Parmi elles se trouvent les métalloenzymes à centre binucléaire de fer non-hémunique comme la méthane monooxygénase et la ribonucléotide réductase (Que, 1995). Nous pouvons citer également les hémoprotéines de type cytochrome P450 (Traylor et coll, 1995) et les enzymes à centre

mononucléaire de fer non-héminique, telles que la naphthalène dioxygénase ou encore les lipoxygénases (Nelson et coll, 1995). Enfin, une série d'enzymes à cofacteurs métalliques variés tels que le molybdène et le cuivre, sont aussi impliquées dans l'activation de l'oxygène (Fox et coll, 1995). Bien que les structures de leur site actif soient très variées, toutes ces enzymes réduisent l'oxygène pour produire des espèces activées sous les formes métal oxo ($M=O$) et métal peroxo ($M-OOH$). Ces formes possèdent des propriétés hautement oxydantes et sont également très électrophiles.

La seconde grande classe d'enzymes regroupe des enzymes à cofacteur flavinique, communément appelées flavoenzymes (Ghisla et coll, 1989). Ces protéines nous intéressent particulièrement au laboratoire. Tout comme les métalloenzymes de la première classe, elles permettent l'activation de l'oxygène par réduction et interviennent dans un nombre important d'oxydations biologiques (Palfey et coll, 1995). Les différentes propriétés de ces enzymes sont décrites dans les sections suivantes.

II Activation de l'oxygène par les enzymes à cofacteurs flaviniques

II.1 *Généralités sur les flavines*

Les flavines sont des molécules organiques dérivées de la vitamine B2, également connue sous le nom de riboflavine. Leurs structures particulières leur confèrent un spectre de réactivité très large. Elles sont, à ce titre, impliquées dans un grand nombre de processus biologiques et en particulier dans les réactions d'oxydation où elles jouent un rôle essentiel en catalysant l'activation de l'oxygène au sein des flavoprotéines (Palfey et coll, 1995).

Avant d'aborder en détail la manière dont les flavines réalisent cette activation de l'oxygène, voyons dans un premier temps les différentes propriétés physicochimiques de ces molécules particulières.

II.1.A Structure chimique

Les flavines sont composées de deux parties distinctes : une structure cyclique, le noyau ou cycle isoalloxazine et une chaîne carbonée greffée en position 10 de ce cycle. La nature de cette chaîne différencie les diverses flavines telles que la riboflavine, le FMN et le FAD dont les structures sont présentées dans la figure 1.

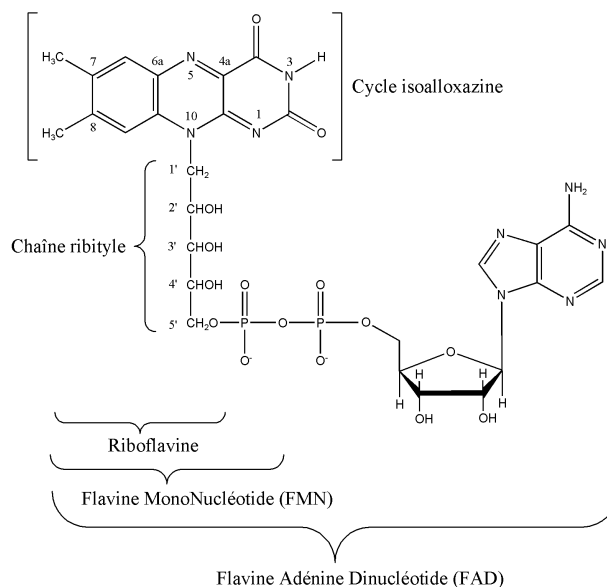


Figure 1. Structures de la riboflavine, du FMN et du FAD

Contrairement à de nombreux micro-organismes (bactéries et champignons) capables de produire de grandes quantités de riboflavine, les organismes supérieurs, comme l'homme, n'ont pas les moyens de synthétiser le cycle isoalloxazine. Ainsi, la riboflavine (vitamine B₂), doit leur être fournie par l'alimentation. Cette molécule joue le rôle de précurseur dans la synthèse des flavines plus complexes. La conversion de la riboflavine en FMN est catalysée par l'ATP:riboflavine 5'-phosphotransférase. Le FMN peut être à son tour transformé en FAD via l'activité ATP:FMN adénylyltransférase (McCormick, 1975).

II.1.B Propriétés rédox

Les flavines doivent l'étendue de leurs diverses fonctions biologiques à leur noyau isoalloxazine. Celui-ci peut exister sous trois états rédox différents (Muller, 1987) :

- la forme oxydée (flavoquinone)
- la forme réduite à 1 électron (flavosemiquinone)
- la forme réduite à 2 électrons (flavohydroquinone).

Chacun de ces états existe sous trois formes distinctes : cationique, neutre ou anionique (figure 2). Parmi les 9 espèces présentées dans la figure 2, seules 5 ont une réalité physiologique. Il s'agit de la flavoquinone neutre (Fl_{ox}), la flavosemiquinone et la flavohydroquinone sous leurs formes neutres et anioniques (FlH^o et Fl^{o-}, Fl_{red}H₂ et Fl_{red}H⁻). Ces cinq formes sont directement reconnaissables à leur couleur caractéristique (figure 2).

Le noyau isoalloxazine de Fl_{ox} peut accepter 1 ou 2 électrons simultanément, et peut les restituer par paire ou un par un. Les couples $\text{Fl}_{\text{ox}}/\text{FlH}^\bullet$, $\text{FlH}^\bullet/\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$ et $\text{Fl}_{\text{ox}}/\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$ constituent à ce titre des couples rédox (tableau I) (Hemmerich et coll, 1977). Les valeurs négatives des différents potentiels d'oxydoréduction de ces couples font des flavines réduites à 1 et 2 électrons, des composés assez réducteurs. Ces propriétés rédox particulières impliquent d'autre part que dans une solution dépourvue d'oxygène, une flavine libre réduite peut réagir avec une flavine oxydée pour former deux semiquinones neutres FlH^\bullet . Ce phénomène réversible, nommé disproportionation ou comproportionation selon le sens considéré (Muller, 1987), est illustré dans la figure 3.

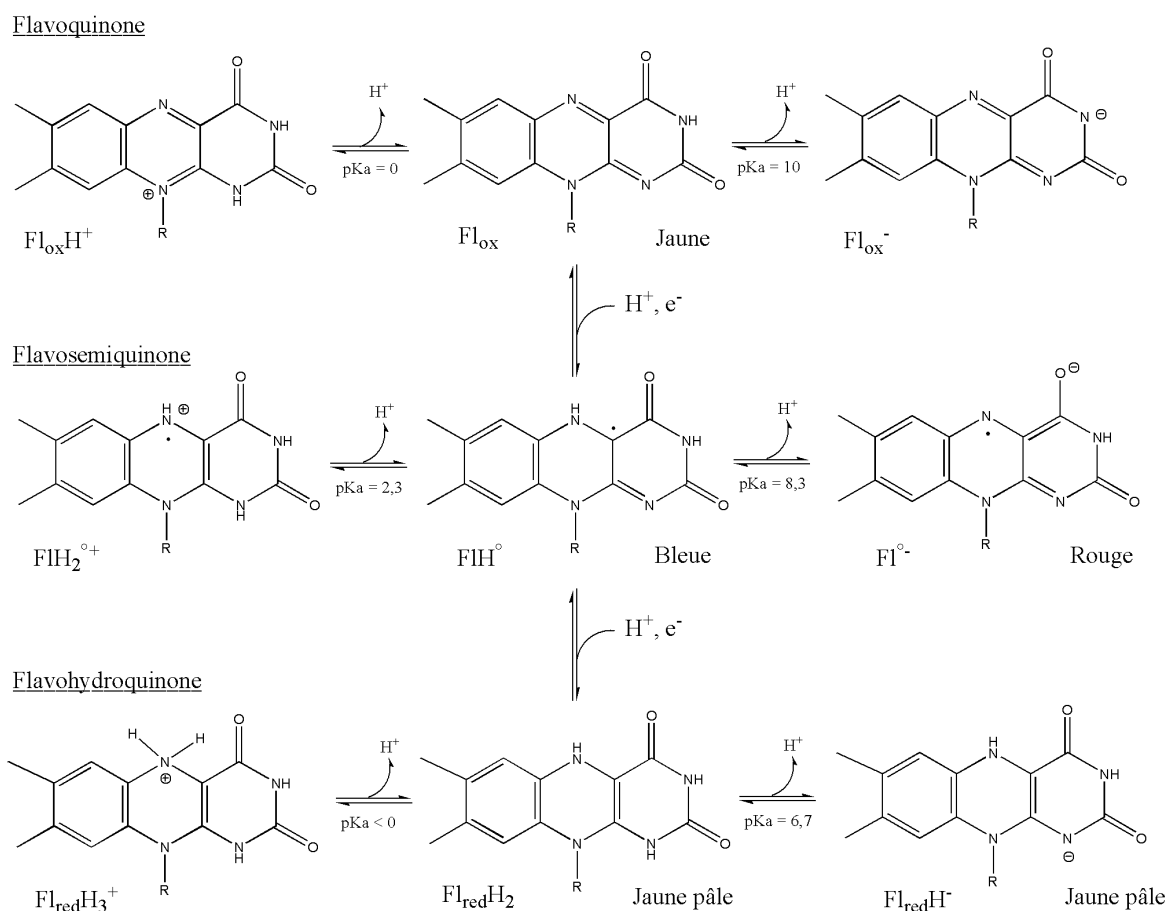


Figure 2. Structures des espèces cationiques, neutres et anioniques des flavines dans leurs trois états rédox (Muller, 1987). La couleur des espèces ayant une réalité physiologique est mentionnée.

Couples rédox	Potentiels rédox standards (pH 7,0)
$\text{FlH}^\bullet / \text{Fl}_{\text{red}}$	- 0,172 V
$\text{Fl}_{\text{ox}} / \text{Fl}_{\text{red}}$	- 0,205 V
$\text{Fl}_{\text{ox}} / \text{FlH}^\bullet$	- 0,240 V

Tableau I. Potentiels des trois couples rédox du FMN libre à pH 7,0 (Hemmerich et coll, 1977).

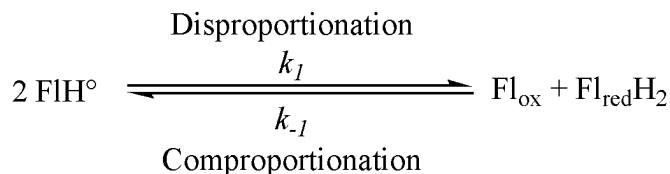


Figure 3. Equilibre entre les différents états rédox de la flavine en absence d'oxygène (Muller, 1987).

II.1.C Propriétés spectrales

Les différentes formes de flavines présentent des spectres UV-visibles caractéristiques qui font apparaître des bandes assez intenses (Massey et coll, 1966). De ce fait, la spectroscopie UV-visible est une technique tout à fait adaptée à l'étude de ces composés flaviniques.

La forme oxydée Fl_{ox} présente deux bandes d'absorption à 375 et 445 nm qui disparaissent dans la forme réduite à 2 électrons ($\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$). La flavosemiquinone dans son état neutre (FlH°), conserve une bande d'absorption à 450 nm et présente également une bande d'absorption dans la région visible entre 570 et 650 nm. Cette bande disparaît dans la semiquinone anionique ($\text{FlH}^{\circ-}$). Au sein des flavoprotéines, l'environnement protéique peut légèrement modifier l'allure de ces spectres. La figure 4 montre les spectres du cofacteur flavinique de la glucose oxydase sous les quatre états qui viennent d'être présentés.

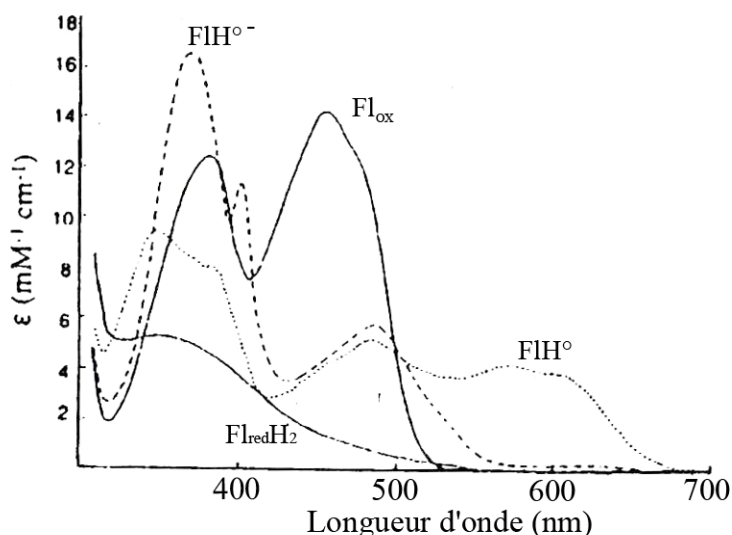


Figure 4. Spectres UV-visibles du cofacteur flavinique de la glucose oxydase dans son état oxydé (Fl_{ox}), réduit ($\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$), semiquinone neutre (FlH°) et semiquinone anionique ($\text{FlH}^{\circ-}$) (Massey et coll, 1966).

II.2 Les flavines : des cofacteurs protéiques

Dans le monde vivant, les flavines sont intégrées au sein de polypeptides de structures variables. Ainsi, les propriétés chimiques des flavines associées à la diversité des environnements protéiques ont permis l'apparition de nombreuses enzymes pouvant catalyser des transformations chimiques variées et ceci avec une multitude de substrats différents. Ces systèmes enzymatiques, appelés flavoprotéines, possèdent au moins une molécule de flavine fortement fixée au sein de leur structure protéique. Celle-ci est alors désignée sous le terme de groupement prosthétique et l'activité enzymatique est totalement dépendante de la présence de ce cofacteur protéique.

Il existe deux modes de fixation de la flavine sur la protéine : les flavines liées à la chaîne polypeptidique de manière covalente et celles qui lui sont associées par un réseau de liaisons non covalentes.

La fixation covalente a lieu entre les chaînes latérales de certains acides aminés (cystéine, histidine, tyrosine) et les carbones 6 ou 8 du cycle isoalloxazine de la flavine (figure 5) (Kim et coll, 1995). Mise à part une augmentation possible du potentiel rédox de 50 à 60 mV, l'interaction d'un acide aminé à cet endroit du cycle ne confère aucune propriété particulière aux flavines. A titre d'exemple, ce type de liaison covalente est observé notamment pour la sarcosine oxydase (Chlumsky et coll, 1998) et la cholestérol oxydase (Croteau et coll, 1996). Ces deux enzymes possèdent comme cofacteur un FAD lié respectivement à une cystéine et à une histidine de façon covalente.

La fixation non covalente est en partie assurée par l'intermédiaire de la chaîne carbonée en position 10 du cycle isoalloxazine (Ghisla et coll, 1989). La figure 5 illustre les différentes interactions possibles dans le cas du FAD. Cette chaîne possède tout d'abord 3 fonctions hydroxyles susceptibles d'établir un réseau de liaisons hydrogènes avec la protéine. Ensuite, la présence d'un ou deux groupements phosphates (FMN ou FAD respectivement) permet d'établir des liaisons électrostatiques. Finalement, dans le cas du FAD, la partie adénosine comporte des groupements azotés et oxygénés susceptibles d'établir des liaisons hydrogènes avec la chaîne polypeptidique. De son côté, le cycle isoalloxazine offre également plusieurs possibilités d'interactions avec les protéines. Ses propriétés amphiphiles lui permettent d'établir des interactions hydrophobes ou de type van der Waals mais également des liaisons hydrogènes.

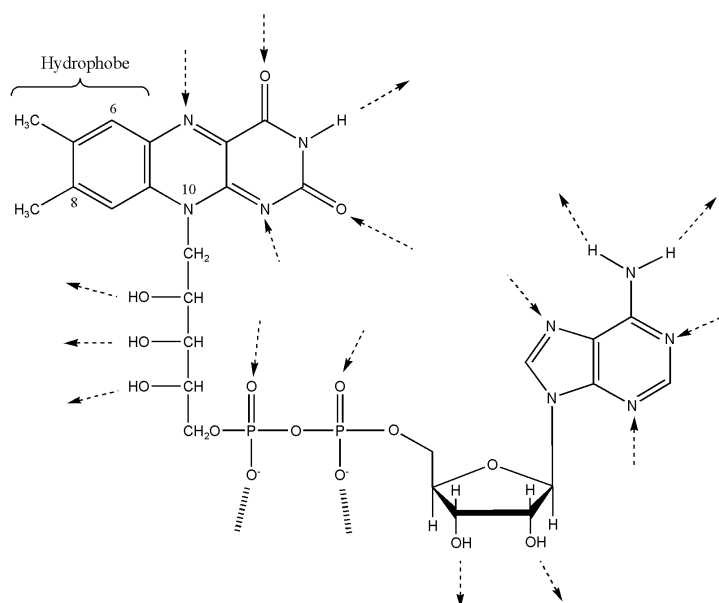


Figure 5. Interactions possibles entre le FAD et la protéine. Les flèches en pointillés et les traits hachurés représentent respectivement les liaisons hydrogènes (donneuses et accepteuses) et les interactions électrostatiques (Ghisla et coll, 1989).

L'ensemble de ces interactions maintient fortement la flavine au sein du site actif des flavoenzymes. Dans le cas de la flavine réductase C(1) d'*Acinetobacter baumannii*, le FMN se fixe à la chaîne polypeptidique avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire (Sucharitakul et coll, 2005).

II.2.A Modulation de la réactivité des flavines

Les flavoenzymes sont impliquées dans la déshydrogénation de nombreux substrats (déshydrogénases) (Ghisla et coll, 2004), le transport d'électrons (Diflavine réductase et flavodoxine) (Carrillo et coll, 2003; Murataliev et coll, 2004; Setif, 2001), la bioluminescence (luciférase) (Meighen, 1991), l'activation et le transfert d'oxygène (hydroxylases, monooxygénases) (Palfey et coll, 1995), les oxydations (oxydases) (Edmondson et coll, 2004), et dans beaucoup d'autres fonctions. Ainsi, le cofacteur flavinique peut permettre de catalyser des réactions très différentes d'un point de vue chimique (Ghisla et coll, 1989). Le type de réactivité associé à une flavoprotéine particulière dépend des interactions entre le noyau isoalloxazine et la chaîne polypeptidique (Ghisla et coll, 1989). Ces interactions régulent finement la réactivité de ce noyau en influençant ses propriétés thermodynamiques. Lorsque les flavines sont libres en solution, le potentiel rédox des couples $\text{Fl}_{\text{ox}}/\text{FlH}^\circ$, $\text{FlH}^\circ/\text{Fl}_{\text{red}}$ et $\text{Fl}_{\text{ox}}/\text{Fl}_{\text{red}}$ se situe aux alentours de - 200 mV (tableau I) (Hemmerich et coll, 1977). Par contre, lorsqu'elles interagissent avec des protéines, ces potentiels évoluent et se répartissent sur une gamme de 600 mV en fonction du type d'interactions développées avec la

chaîne polypeptidique. En effet, il a été rapporté un potentiel de - 495 mV pour le couple $\text{FlH}^\circ/\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}$ de la flavodoxine de *Azotobacter vinelandii* (Barman et coll, 1972) et de + 80 mV pour le couple $\text{Fl}_{\text{ox}}/\text{FlH}^\circ$ de la thiamine déshydrogénase (Gomez-Moreno et coll, 1979).

La réactivité des flavines peut ainsi être fortement influencée par les propriétés du site actif des enzymes auxquelles elles sont fixées. C'est le cas en particulier lorsque les flavines réduites réagissent avec leur accepteur d'électrons privilégié : l'oxygène. En effet, bien que la réaction des flavines réduites libres avec l'oxygène aboutisse à la formation de superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$ (Bruce, 1984; Massey, 1994; Muller, 1987), lorsque elles sont complexées à certaines enzymes, leur réaction avec l'oxygène est contrôlée et aboutit à la formation d'un adduit peroxyde sur leur cycle isoalloxazine. Cet hydroperoxyflavine est alors capable de transférer efficacement un atome d'oxygène à un substrat (Palfey et coll, 1995). Les flavoprotéines qui contrôlent ainsi la réactivité de la flavine avec l'oxygène, appartiennent à la famille des flavoprotéines hydroxylases.

Afin de bien comprendre comment ce contrôle s'effectue, voyons dans un premier temps les propriétés des flavines libres réduites lorsqu'elles réagissent avec l'oxygène.

II.3 Réactivité des flavines réduites libres avec l'oxygène

Les flavines réduites sont très réactives vis-à-vis de l'oxygène. Elles ont le pouvoir de le réduire à 1 ou 2 électrons, produisant respectivement l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces réactions ont été particulièrement bien décrites dans différentes revues d'où est tirée la figure 6. Celle-ci résume les différentes voies de réaction des flavines avec l'oxygène moléculaire (Bruce, 1984; Massey, 1994; Muller, 1987). L'oxydation de l'hydroquinone ($\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}$) par l'oxygène moléculaire conduit dans un premier temps à la formation d'une paire de radicaux contenant une flavosemiquinone et un superoxyde ($\text{FlH}^\circ/\text{O}_2^{\circ-}$, étape a). Cette paire, très instable, peut évoluer selon deux voies réactionnelles. La première correspond à la recombinaison radicalaire (étape b) de ces deux espèces. Elle aboutit à l'apparition d'un intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine (FlHOOH) (Anderson, 1982) qui, en milieu aqueux, se dissocie de façon hétérolytique en Fl_{ox} et H_2O_2 (étape c). Dans la seconde voie réactionnelle, la paire de radicaux se dissocie, libérant le superoxyde et la flavosemiquinone (étape d). D'après la loi de conservation de spin, le superoxyde triplet doit être converti en singulet, afin de pouvoir réagir avec la flavosemiquinone pour former l'intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine singulet. Or cette inversion de spin du superoxyde est limitée par une barrière d'activation importante. La dissociation radicalaire (étape d) qui

ne nécessite pas cette inversion de spin est donc beaucoup plus rapide que la formation du C(4a)-hydroperoxyflavine (étape b). Par conséquent, l'oxydation des flavines réduites libres par l'oxygène moléculaire produit essentiellement du superoxyde et de la flavosemiquinone.

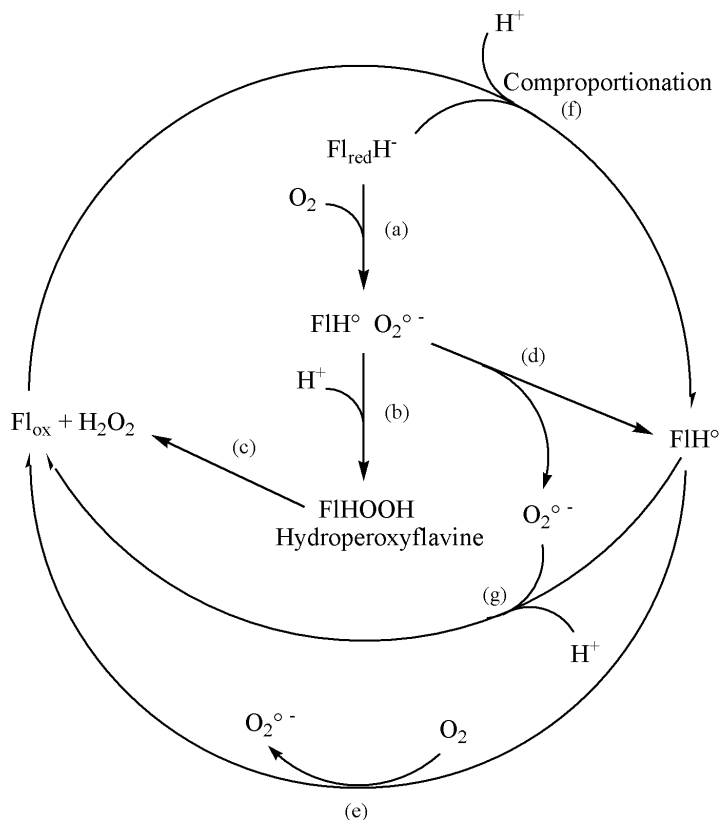


Figure 6. Réactions de la flavine libre réduite avec l'oxygène. Les constantes de vitesse sont mesurées à pH 6,5 et à 20°C (Bruce, 1984; Massey, 1994; Muller, 1987).

La production de $\text{O}_2^{\circ-}$ par oxydation de $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ est autocatalytique. Elle entraîne l'apparition de FIH° (étape a et d) qui réagit très rapidement avec l'oxygène et se transforme finalement en Fl_{ox} (étape e). Par le jeu de la comproportionation (figure 3) avec $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ (étape f), Fl_{ox} va accélérer la formation de FIH° qui, par voie de conséquence, augmentera la vitesse de réduction de O_2 en $\text{O}_2^{\circ-}$.

La production d' H_2O_2 à partir de superoxyde et de FIH° est théoriquement possible (étape g). Cependant, bien que la constante de vitesse de cette étape soit assez élevée ($k \sim 1.10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), la faible concentration de $\text{O}_2^{\circ-}$ rend cette réaction excessivement lente devant les réactions de FIH° et $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ avec O_2 .

En résumé, les flavines réduites libres en solution ont la capacité de réduire très efficacement l'oxygène, produisant exclusivement du superoxyde $O_2^{\circ-}$ et de la flavine oxydée Fl_{ox} . Nous allons voir cependant que cette réactivité particulière est totalement modifiée lorsqu'elles sont complexées en tant que cofacteur aux flavoprotéines hydroxylases.

II.4 Les flavoprotéines hydroxylases

II.4.A Généralités

Ces enzymes catalysent l'activation de l'oxygène via un cofacteur flavinique afin d'intégrer un atome d'oxygène au sein d'un substrat (Palfey et coll, 1995). Elles y parviennent en favorisant la formation d'un intermédiaire C(4a) hydroperoxyflavine (figure 7) à partir de flavine réduite, au sein de leur site actif (figure 6, étape a et b). Cette espèce joue un rôle central dans leur cycle catalytique. Elle contient au niveau de son C(4a) une molécule d'oxygène activée sous forme peroxyde O_2^{2-} qui lui permet d'hydroxyler très efficacement un substrat.

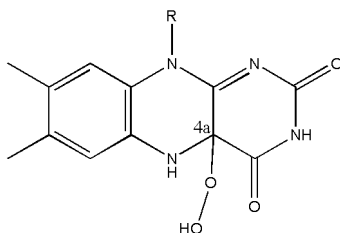


Figure 7. Structure de l'hydroperoxyflavine (FLOOH).

La réaction catalysée par les flavoprotéines hydroxylases nécessite trois partenaires : le NAD(P)H qui joue le rôle de donneur d'électrons à la flavine, le substrat accepteur d'oxygène et l'oxygène moléculaire. D'un point de vue général, le cycle catalytique de ces enzymes peut être divisé en deux étapes (figure 8). Le cofacteur flavinique oxydé est tout d'abord réduit à deux électrons par le NAD(P)H (1) ; la flavine réduite réagit dans un deuxième temps avec l'oxygène moléculaire pour former l'intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine qui catalyse l'hydroxylation du substrat. En fin de réaction, de l'eau est libérée et le cofacteur oxydé est régénéré (2).

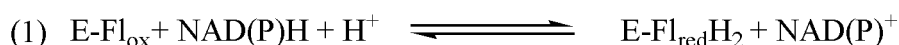


Figure 8. Cycle catalytique des flavoprotéines hydroxylases. (1) et (2) représentent respectivement les demi-réactions de réduction et d'oxydation du cofacteur flavinique (Palfey et coll, 1995).

Dans cette réaction, la flavine joue deux rôles très différents : d'une part, elle oxyde le NAD(P)H et d'autre part, elle active l'oxygène par réduction en formant une espèce hydroperoxyflavine. Cette double fonctionnalité est due à l'architecture originale du site actif des flavoprotéines hydroxylases (Entsch et coll, 2005; Palfey et coll, 1995).

La section suivante permet de mieux comprendre cette notion en prenant comme exemple le mécanisme réactionnel de la para-hydroxybenzoate hydroxylase, un membre particulièrement bien caractérisé de cette famille de protéines (Entsch et coll, 2005).

II.4.B La para-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH)

Cette enzyme intervient dans la première étape du catabolisme du para-hydroxybenzoate. Elle catalyse l'hydroxylation aromatique de ce dernier par l'oxygène moléculaire en présence de NADPH via un cofacteur FAD (figure 9) (Entsch et coll, 2005; Husain et coll, 1979).

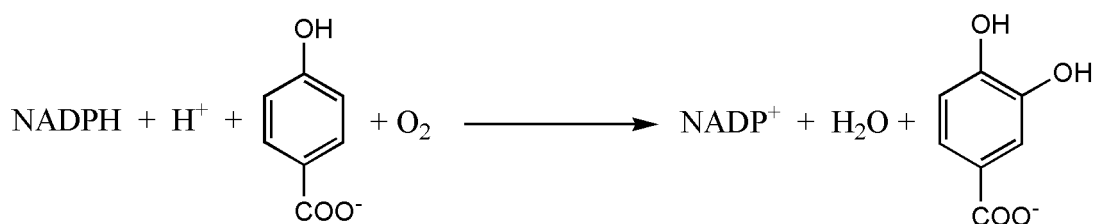


Figure 9. Réaction d'hydroxylation catalysée par la para-hydroxybenzoate hydroxylase (Husain et coll, 1979).

Au cours du cycle catalytique de la para-hydroxybenzoate hydroxylase, le complexe enzyme-cofacteur adopte trois conformations distinctes nommées « in » « out » et « open » (Entsch et coll, 2005). Dans la conformation « in », le cycle isoalloxazine du FAD est isolé du solvant alors qu'en conformation « out », il est exposé vers l'extérieur du site actif de l'enzyme. Dans la conformation « open », le complexe enzyme-cofacteur adopte une forme intermédiaire qui permet la fixation du substrat et la libération du produit.

Durant la première étape du cycle catalytique, l'enzyme en équilibre entre les conformations « in » et « open », fixe le para-hydroxybenzoate (pOHB) (figure 10, étape 1). Cet évènement provoque le déplacement de l'équilibre vers la conformation « out » de l'enzyme qui peut alors réagir avec le NADPH (étape 2) (Frederick et coll, 2001; Palfey et coll, 2002). La réduction de son cofacteur FAD par le NADPH entraîne une relocalisation de ce dernier en conformation « in », où il peut réagir efficacement avec l'oxygène moléculaire

(étape 3) (Ortiz-Maldonado et coll, 2001). Un intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine (étape 4, intermédiaire I) est ainsi formé puis stabilisé par les différents résidus du site actif (Schreuder et coll, 1994). Les propriétés physicochimiques et la structure de cet environnement, empêchent toute réaction secondaire avec les molécules du solvant et préviennent la dégradation du C(4a)-hydroperoxyflavine en flavine oxydée et H_2O_2 (figure 6, étape c). Cet intermédiaire peut alors réaliser une attaque électrophile du pOHB pour former l'intermédiaire II (étape 5) (Ortiz-Maldonado et coll, 2003). Celui-ci se transforme en une hydroxyflavine (étape 6, intermédiaire III) et le 3,4 DOHB est produit. Enfin, dans la dernière étape du cycle (étape 7), l'hydroxyflavine libère une molécule d'eau, régénère le FAD oxydé et le produit est libéré.

Notons que l'étape de réduction du cofacteur FAD par le NADPH est fortement régulée par le pOHB. En effet, la présence de ce dernier augmente d'un facteur 140 000 la vitesse de cette étape (Husain et coll, 1979).

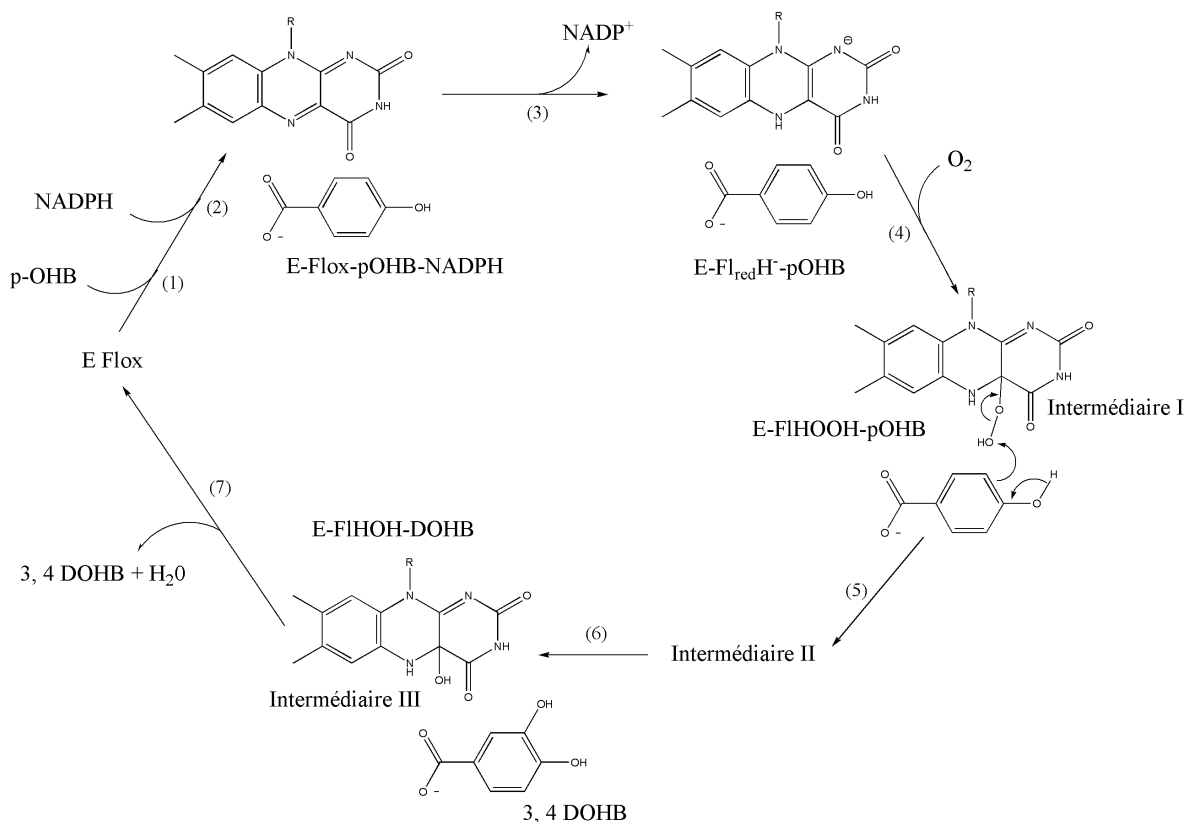


Figure 10. Cycle catalytique de la para-hydroxybenzoate hydroxylase.

Ces trois intermédiaires (C(4a)-hydroperoxyflavine, intermédiaire II et hydroxyflavine) possèdent des spectres UV-visibles différents de ceux de la flavine réduite et oxydée (figure 11) (Entsch et coll, 1989; Entsch et coll, 1976).

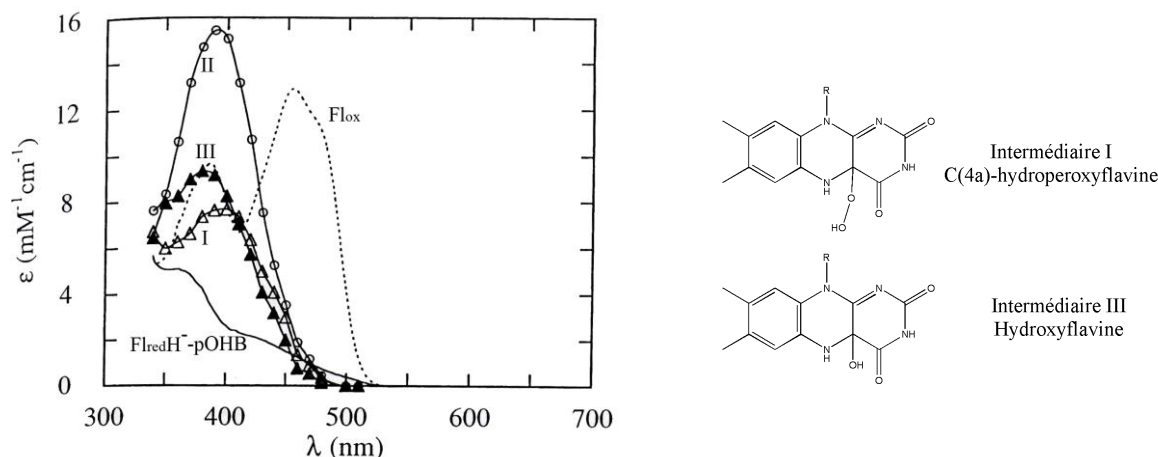


Figure 11. Spectres UV-visibles des différentes espèces flaviniques formées au cours du cycle catalytique de la PHBH et structures des intermédiaires I et III (Entsch et coll, 1989; Entsch et coll, 1976).

En effet, ils présentent une seule bande majoritaire aux alentours de 380 nm dont l'intensité et le λ_{max} diffèrent selon l'intermédiaire considéré.

Le C(4a) hydroperoxyflavine est une espèce très réactive (Palfey et coll, 1995). Comme il a été décrit plus haut (figure 6), lorsqu'il est libre en solution, cet intermédiaire se décompose instantanément en H_2O_2 et flavine oxydée. Cependant, lorsqu'il est complexé à une enzyme telle que la PHBH, sa réactivité est contrôlée (Schreuder et coll, 1990). La dynamique particulière de la flavine au sein du site actif est à l'origine de ce contrôle. La figure 12 illustre le positionnement du FAD au sein du site actif de la PHBH dans les conformations « in » et « out ».

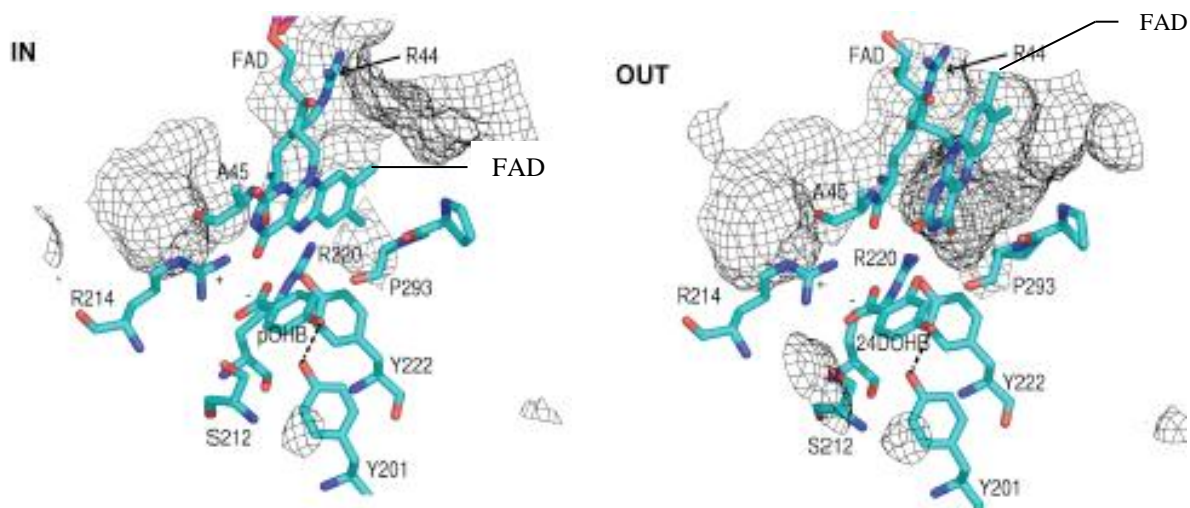


Figure 12. Structures du site actif de la PHBH avec son cofacteur en conformation « in », en présence de pOHB, et en conformation « out », en présence d'un analogue de produit, le 2,4 DOHB (Schreuder et coll, 1994).

Cette figure montre que l'accès du cycle isoalloxazine au solvant est différent selon la conformation considérée. La conformation « out » expose le N(5) du cycle et favorise l'étape de réduction du cofacteur par le NADH (Palfey et coll, 1997). La conformation « in » enfouit le cycle au sein de l'enzyme. Elle empêche donc toute interaction du C(4a) hydroperoxyflavine avec le solvant et permet l'hydroxylation du substrat (Schreuder et coll, 1990).

Dans ce système, la double réactivité de la flavine est donc dictée par la dynamique de l'enzyme qui oscille entre ses conformations « in » et « out ».

La PHBH a été considérée pendant longtemps comme un paradigme des hydroxylases flavine-dépendantes. Cependant, depuis une dizaine d'années, un nouveau type d'hydroxylases flavine-dépendantes a été identifié. Leurs propriétés sont présentées dans la section suivante.

III Les hydroxylases flavine-dépendantes à deux composants

Ces systèmes sont également capables de catalyser des réactions d'hydroxylation par l'oxygène moléculaire en présence de flavine (FAD ou FMN) et de NAD(P)H. Cependant, à la différence des flavoprotéines hydroxylases, deux enzymes distinctes, une flavine réductase et une monooxygénase, toutes deux dépourvues de cofacteur flavinique, sont nécessaires pour catalyser cette réaction.

III.1 Propriétés générales

Lorsque notre projet a débuté, un faible nombre d'hydroxylases à deux composants avait été identifié. A titre d'exemple, quelques unes sont référencées dans le tableau II. Ces enzymes forment une famille nommée TC-FDM pour « Two-Components Flavin-Diffusible Monooxygenases » (Galan et coll, 2000) et n'ont été identifiées jusqu'à présent que chez les microorganismes. Cette famille est définie selon les critères suivants :

- La flavine réductase et l'hydroxylase (ou monooxygénase) d'un même couple sont codées par deux gènes différents.
- Les deux enzymes ne sont pas des flavoprotéines, elles ne possèdent pas de cofacteur flavinique.
- La flavine réductase utilise le NAD(P)H pour réduire une flavine libre qui est transférée à l'hydroxylase afin de permettre l'oxydation du substrat par l'oxygène moléculaire.

III.1.A Les flavine réductases

L'activité flavine réductase est connue depuis une trentaine d'années. Ces enzymes sont capables de catalyser la réduction de flavines libres par le NAD(P)H (Duane et coll, 1975; Fieschi et coll, 1995; Jablonski et coll, 1977) (figure 13).

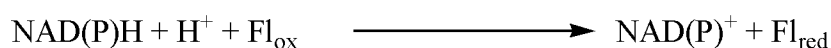


Figure 13. Réaction catalysée par les flavine réductases.

Les flavine réductases sont impliquées dans des processus biologiques très variés. Elles interviennent dans le phénomène de bioluminescence (Duane et coll, 1975), l'activation de l'oxygène (Gaudu et coll, 1994), le métabolisme du fer (Fontecave et coll, 1994), et l'activation de la ribonucléotide réductase, une enzyme intervenant dans le métabolisme des désoxyribonucléosides (Fontecave et coll, 1987).

Les flavine réductases présentent de nombreuses différences concernant leur mécanisme enzymatique et leur spécificité de substrat vis-à-vis des donneurs (NADPH ou

NADH) et des accepteurs d'électrons (FAD ou FMN) (Duane et coll, 1975; Fieschi et coll, 1995; Jablonski et coll, 1977).

Ces enzymes peuvent être classées en deux groupes, en fonction de la présence ou de l'absence d'un cofacteur flavinique au sein de leur site actif. Le premier groupe rassemble les flavine réductases de type flavoprotéines. Ces enzymes possèdent une flavine cofacteur essentielle au transfert d'électron entre le NAD(P)H et la flavine substrat. Parmi elles se trouvent la sulfite réductase d'*E. coli* (Eschenbrenner et coll, 1995) et la FRP de *Vibrio harveyi* (Lei et coll, 1994) qui intervient dans le phénomène de bioluminescence. Dans le second groupe se trouvent les enzymes dépourvues de cofacteur flavinique : les flavine réductases non flavoprotéiques. La flavine réductase Fre d'*E. coli* est la première enzyme de ce groupe à avoir été clonée (Spyrou et coll, 1991) et caractérisée en détail (Fieschi et coll, 1995). Depuis, d'autres protéines ont été identifiées, révélant une diversité supplémentaire au sein de ce groupe. Ainsi, il existe trois sous-groupes d'enzymes reliées par leur identité de séquence. On distingue les flavine réductases de type Fre (Spyrou et coll, 1991), les flavine réductases des organismes supérieurs (FLR bovine et humaine), (Chikuba et coll, 1994; Quandt et coll, 1994) et enfin, celles qui nous intéressent tout particulièrement, les flavine réductases de la famille TC-FDM (Galan et coll, 2000).

Les différentes flavine réductases de la famille TC-FDM possèdent des pourcentages d'identité de séquence assez élevés (la plupart atteignent environ 30 %). Par contre, elles ne partagent aucune homologie avec les autres flavine réductases présentées précédemment et elles font donc partie à ce titre d'une famille d'enzymes bien distincte (Galan et coll, 2000).

III.1.B Les monooxygénases/hydroxylases flavine-dépendantes associées aux flavine réductases

Les monooxygénases ou hydroxylases appartenant à la famille TC-FDM sont capables de catalyser l'hydroxylation d'un substrat par l'oxygène moléculaire en présence d'une flavine réductase, de NAD(P)H, et de flavine libre (figure 14).

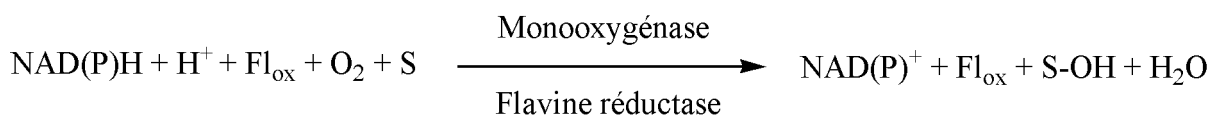


Figure 14. Réaction d'hydroxylation catalysée par les monooxygénases flavine-dépendantes en présence d'une flavine réductase.

A la différence des flavine réductases décrites ci-dessus, les monooxygénases de cette famille n'avaient fait l'objet d'aucune étude détaillée au début de notre projet. Ces protéines ne partagent pas d'identités de séquence significatives entre elles ($\leq 30\%$). Cependant, la comparaison de leur séquence fait tout de même apparaître certains motifs strictement conservés (Galan et coll, 2000). Elles possèdent à ce titre un domaine similaire au motif de fixation du cofacteur flavinique de l'acyl coenzyme A deshydrogénase (Galan et coll, 2000; Kim et coll, 1988). Sur la base du mécanisme bien connu des flavoprotéines hydroxylases décrit précédemment, il a été proposé qu'elles soient capables de fixer et d'utiliser la flavine réduite afin de catalyser une réaction d'hydroxylation en présence d'oxygène moléculaire. Cependant, au début de mon projet, ceci n'avait pas encore été démontré et le détail du mécanisme enzymatique de ces monooxygénases restait à découvrir.

Depuis ces dernières années, plusieurs dizaines d'hydroxylases à deux composants ont été identifiées. Néanmoins, seules quelques unes ont fait l'objet d'une caractérisation biochimique détaillée. Nous présenterons ici, la 4-hydroxyphénylacétate 3-hydroxylase et la sulfure dibenzothiophène monooxygénase, les systèmes les mieux connus au début de mon projet. Ensuite, nous détaillerons le système ActVA-ActVB, dont la caractérisation est détaillée dans la suite de ce manuscrit.

Introduction bibliographique

Tableau II : Exemples d'hydroxylases à deux composants mises en évidence chez différents microorganismes.

<i>Enzyme</i>	<i>Spécificité de substrat</i>	<i>Flavine Réductase</i>	<i>Monooxygénase ou Hydroxylase</i>	<i>Organisme</i>	<i>Référence</i>
(Tri)-chlorophénol 4-mono-oxygénase	FAD, NADH	HadB, TftC	HadA, TftD	<i>Burkholderia pickettii</i> et <i>Burkholderia cepacia</i> AC100	(Hubner et coll, 1998; Kiyohara et coll, 1992; Martin et coll, 1999; Xun, 1996)
Phénol hydroxylase	FAD	PheA2	PheA1	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	(Duffner et coll, 2000; Duffner et coll, 1998; Kirchner et coll, 2003)
Pyrrole-2-carboxylate mono-oxygénase	FAD, NADH	Petite sous-unité	Grande sous-unité	<i>Rhodococcus sp.</i>	(Becker et coll, 1997)
Biosynthèse de la pristinamycine	FMN, NADH	SnaC	SnaA et SnaB	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	(Blanc et coll, 1995)
Dégradation des acides aminopolycarboxyliques (EDTA, NTA)	FMN, NADH	cB, cB', EmoB	cA, cA', EmoA	<i>Chelatobacter. heintzii</i> , <i>DSM9103, Bacterium BCN1</i>	(Bucheli-Witschel et coll, 2001; Egli et coll, 1990; Knobel et coll, 1996; Witschel et coll, 1997; Xu et coll, 1997)
Biosynthèse de la granaticine	—	ORF34	ORF21	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	(Ichinose et coll, 1998)
Dégradation du dibenzithiophène	FMN, NADH	DszD	DszA et DszC	<i>Rhodococcus erythropolis</i> D-1	(Matsubara et coll, 2001)
Dégradation du p-hydroxyphénylacetate	FMN, NADH	HpaC	HpaB	<i>Echerichia coli W</i>	(Galan et coll, 2000; Xun et coll, 2000)

III.2 *La 4-hydroxyphénylacétate 3-hydroxylase*

Certaines bactéries sont capables d'utiliser les composés aromatiques comme source d'énergie pour mener à bien leur croissance. C'est en particulier le cas d'*Echerichia coli W* qui a la capacité de se développer en présence d'acide hydroxyphénylacétique. La dégradation oxydative de ce composé génère les acides pyruvique et succinique, tout deux impliqués dans le métabolisme énergétique de ce microorganisme.

La première étape de cette voie de dégradation consiste en une hydroxylation de l'acide hydroxyphénylacétique (figure 15).

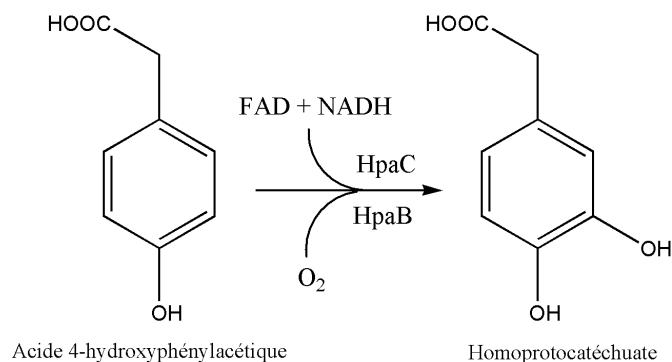


Figure 15. Première étape de la voie de dégradation de l'acide hydroxyphénylacétique chez *Escherichia coli* W.

Cette étape est catalysée par deux enzymes nommées HpaB et HpaC. Elle nécessite la présence d'oxygène moléculaire, de FAD et de NADH (Galan et coll, 2000; Xun et coll, 2000).

HpaC est une flavine réductase homodimérique de 2×19 kDa (Galan et coll, 2000). Elle est capable de catalyser la réduction du FAD, du FMN et de la riboflavine par le NADH avec des paramètres cinétiques similaires ($K_m = 2,1 ; 3,1$ et $2,6 \mu\text{M}$ respectivement) (Galan et coll, 2000). A la différence de certaines flavine réductases telles que FRP de *Vibrio harveyi* (Lei et coll, 1994) ou encore FraseI de *Vibrio fischeri* (Tang et coll, 2001), cette enzyme ne possède pas de cofacteur flavinique et elle utilise la flavine uniquement en tant que substrat. Les détails de son mécanisme enzymatique restent encore inconnus.

HpaB est un homodimère de 2×59 kDa (Xun et coll, 2000). En présence de FAD, de NADH, d'oxygène moléculaire et de son partenaire HpaC, cette enzyme catalyse l'hydroxylation de l'acide hydroxyphénylacétique (Xun et coll, 2000). Le couple HpaB-HpaC constitue une hydroxylase à deux composants que nous nommerons par la suite 4-hydroxyphénylacétate 3-hydroxylase. Dans ce système, HpaC génère le FADH₂, celui-ci est transféré à HpaB, qui catalyse l'hydroxylation de l'acide hydroxyphénylacétique par l'oxygène moléculaire.

Le mécanisme de transfert de flavine étant alors inconnu, il a été suggéré qu'un complexe entre HpaB et HpaC était nécessaire pour convoyer la flavine de la réductase vers l'hydroxylase (Galan et coll, 2000). Cependant, plusieurs expériences ont permis d'infirmer cette hypothèse. Tout d'abord, lorsque les deux enzymes sont physiquement séparées par une membrane perméable au FAD, l'activité hydroxylase mesurée est similaire à celle d'une expérience où les deux protéines sont réunies (Galan et coll, 2000). De plus, cette activité n'est pas affectée lorsque HpaC est remplacée par une flavine réductase non homologue telle que Fre d'*Escherichia coli* (Xun et coll, 2000).

Ainsi, le transfert de FAD ne nécessite pas de complexe entre HpaB et HpaC. La flavine semble se déplacer d'une protéine à l'autre par diffusion passive. Elle doit donc posséder une affinité différente pour les deux enzymes.

Le mécanisme de transfert de flavine n'a pas été étudié en détail et aucune information quantitative sur l'affinité de ces deux protéines pour la flavine n'a été rapportée. Il en est de même pour le mécanisme d'activation de l'oxygène par le système HpaB:FADH₂. Par analogie aux flavoprotéines hydroxylases comme la PHBH, la formation d'un intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine a été proposée pour expliquer cette étape (Xun et coll, 2000). Cependant la présence d'une telle molécule au sein de HpaB n'a pas été mise en évidence.

III.3 La sulfure dibenzothiophène monooxygénase

La combustion des composés soufrés présents dans le pétrole est à l'origine de sérieux problèmes environnementaux. Face à cette problématique, un procédé chimique capable de dégrader ces composés toxiques (l'hydrosulfuration) a été développé durant les années 70 (Topsoe et coll, 1996). Cependant, bien que ce traitement soit d'une grande efficacité, certaines molécules aromatiques soufrées y sont résistantes. C'est le cas du dibenzothiophène (DBT), l'un des polluants les plus toxiques contenus dans le pétrole. Récemment, Gray et

collaborateurs ont mis en évidence une bactérie, nommée *Rhodococcus sp IGTS8*, capable de dégrader ce type de molécule (Gray et coll, 1996). L'étude de son métabolisme a permis d'identifier les différentes étapes du catabolisme du DBT et les enzymes qui y sont associées.

La première étape de cette voie de dégradation consiste en l'hydroxylation du DBT (figure 16).

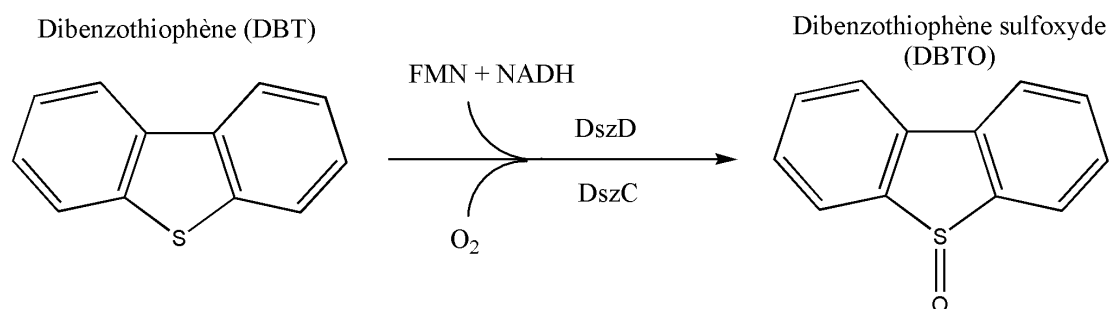


Figure 16. Première étape de la voie de dégradation du dibenzothiophène chez *Rhodococcus sp IGTS8* (Gray et coll, 1996).

Cette étape est catalysée par deux enzymes nommées DszC et DszD. Elle nécessite la présence d'oxygène moléculaire, de FMN et de NADH (Konishi et coll, 2002; Matsubara et coll, 2001).

DszD est une flavine réductase homotétramérique de 4×22 kDa (Matsubara et coll, 2001). Elle catalyse la réduction du FMN par le NADH avec des valeurs de K_m pour le NADH et le FMN de 218 et 11 μ M respectivement. Cette activité réductase ne nécessite pas de cofacteur flavinique et, de la même manière que pour HpaC, les détails de son mécanisme catalytique sont encore inconnus.

DszC est une monooxygénase homodimérique de 2×45 kDa. En présence de FMN_{red}, elle est capable de catalyser l'hydroxylation du DBT par l'oxygène moléculaire (Lei et coll, 1996). Dans des conditions physiologiques, le FMN_{red} lui est fourni par la flavine réductase DszD et les deux enzymes forment une monooxygénase à deux composants nommée Sulfure dibenzothiophène monooxygénase (Lei et coll, 1996).

Comme dans le cas de la 4-hydroxyphénylacétate hydroxylase (HpaB-HpaC), cette activité ne semble pas nécessiter d'interaction entre les deux enzymes. Il a donc été proposé que le transfert de flavine d'une protéine à l'autre s'effectue via un processus de diffusion

passive. De manière intéressante, l'état rédox de la flavine influence considérablement son affinité pour la monooxygénase DszC. Cette dernière possède une bien meilleure affinité pour le FMN_{red} que pour le FMN_{ox} ($K_d \text{ FMN}_{red} < 0,01 \mu\text{M}$ et $K_d \text{ FMN}_{ox} = 7 \mu\text{M}$) (Lei et coll, 1996).

Finalement, l'étude de l'activité hydroxylase du système DszD-DszC en présence d'un isotope de l'oxygène ($^{18}\text{O}_2$), a permis de montrer que l'atome d'oxygène incorporé au sein du DBT, provenait de l'oxygène moléculaire. Cependant, le mécanisme de cette incorporation n'a pas été étudié en détail (Lei et coll, 1996).

III.4 Le système ActVA-ActVB impliqué dans la biosynthèse de l'actinorhodine chez *Streptomyces coelicolor*

L'actinorhodine est un antibiotique produit par une bactérie filamenteuse nommée *Streptomyces coelicolor* (Fernandez-Moreno et coll, 1992). Il appartient à la famille des polykétides, un ensemble de composés naturels formés par condensation de plusieurs unités d'acides carboxylique et propionique (Hopwood, 1997). La biosynthèse de l'actinorhodine fait intervenir une vingtaine de gènes regroupés au sein d'une même région du chromosome bactérien nommée « act cluster » (Fernandez-Moreno et coll, 1992). Celle-ci, est composée de huit sous parties (actI – actVII, figure 17). Chacune d'elles peut contenir un ou plusieurs cadres ouverts de lecture ou Orf (Open Reading Frame). A titre d'exemple, actVA contient 6 Orfs distincts (Caballero et coll, 1991) alors que ActVB n'en contient qu'un seul (Fernandez-Moreno et coll, 1992).

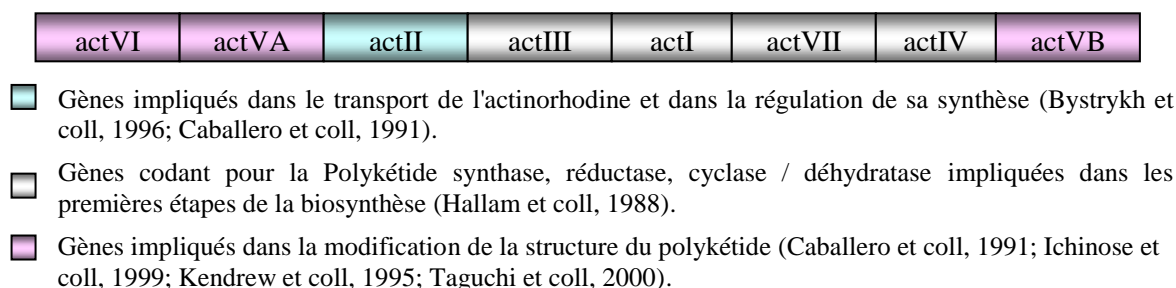


Figure 17. Organisation des régions codantes des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'actinorhodine chez *Streptomyces Coelicolor*.

Les rôles des gènes contenus dans ces différentes sous parties ont été identifiés par des expériences de génétique, en isolant et en caractérisant les mutants qui accumulent les intermédiaires de cette biosynthèse.

Il a été montré en particulier que la dernière étape de cette voie de biosynthèse impliquait deux gènes nommés *actVB* et *actVA-Orf5*, issus respectivement des sous parties *actVB* et *actVA* (Cole et coll, 1987). Cette étape correspond à la formation de l'actinorhodine via l'hydroxylation et la dimérisation de la dihydrokalafungine (DHK) (figure 18).

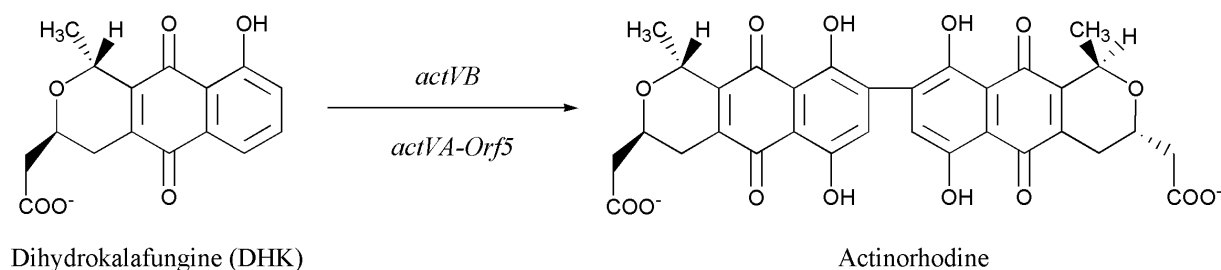


Figure 18. Dernière étape de biosynthèse de l'actinorhodine (Rudd et coll, 1979).

L'enzyme codée par le gène *actVB* que nous nommerons par la suite ActVB, a été caractérisée pour la première fois en 1995 (Kendrew et coll, 1995). Depuis, son mécanisme catalytique a été étudié en détail dans notre laboratoire (Filisetti et coll, 2003).

ActVB est une flavine réductase homodimérique de 2×18 kDa (Filisetti et coll, 2003). Elle est capable de catalyser la réduction, par le NADH, de différentes espèces flaviniques telles que le FMN, le FAD ou encore la riboflavine, avec des paramètres cinétiques similaires ($k_{cat} \sim 10 \text{ s}^{-1}$ et K_m 1-10 μM). L'étude du mécanisme catalytique de ActVB a permis de montrer que la réduction des flavines est réalisée selon un mécanisme de type séquentiel ordonné. Le détail de ce mécanisme est présenté dans la figure 19.

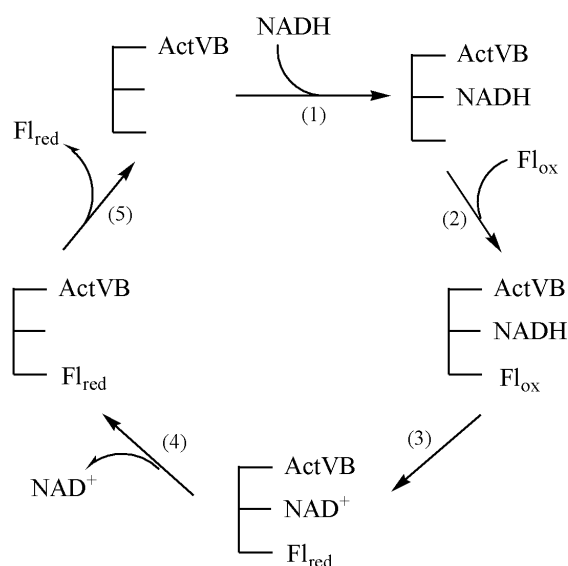


Figure 19. Mécanisme catalytique séquentiel ordonné de ActVB (Filisetti et coll, 2003).

Durant les deux premières étapes du cycle catalytique, ActVB fixe le NADH (étape 1), puis la flavine oxydée (Fl_{ox}, étape 2). La flavine est ensuite réduite (Fl_{red}) par le NADH via un transfert d'hydrure (étape 3) et les deux produits, le NAD⁺ puis Fl_{red}, sont libérés de façon séquentielle (étapes 4 et 5).

Des alignements de séquences ont permis de mettre en évidence que ActVB est homologue à certaines flavine réductases de la famille TC-FDM (Galan et coll, 2000) et en particulier à HpaC et DszD, les deux enzymes présentées précédemment (figure 20).

Sc. ActVB	-----MAADQGMLRDAMARVPAGVALVTAHDRGGVPHGF
Re. Dsz D	MSDKPNAVSSHTTPDVPEVAATPELSTGICAGDYRAALRRHPAGVTVVTLDSGTGPVGF
Ec. HpaC	-----MQLDEQRLRFRDAMASLSAAVNIIIT-TEGDAGQCGI
	* *: .*. * : * : . *
Sc. ActVB	TASSFVSVSMEPPLALVCLARTANSFPVFDSCGEFAVSVLRDHTDLAMRFARKS----A
Re. DszD	TATSFSVSLEPPLVSFNIAETSSSINALKAAESLVIHLGEGHQHLAQRFARSA----D
Ec. HpaC	TATAVCSVTDTPPSLMVCINANSAMNPVFQNGKLCVNVLNHEQELMARHFAGMTGMAME
	** : . * : * * . : . : . . . : : * . : : * : * * :
Sc. ActVB	DKFAGG-EFVRTARGATVLDGAVAVVECTVHERYPAGDHIILLGEVQSVHVEEKGVPAVY
Re. DszD	QRFADSLWAVLDTGEPVLHGTSPWMRVKVDQLIPVGDHTLVIGLVTRVHAE-----
Ec. HpaC	ERFSLSCWQKGPLAQPVLGSLASLEGEIRDVQAIETHLVYLVEIKNIILSAEG-----
	:: * : : . * * * : : : : * * : : : : :
Sc. ActVB	VDRRFAALCSAAGACPSATGRGVPAHAG-
Re. DszD	-----DDESAAAPLLYHEGKYRPTPLGQ
Ec. HpaC	-----HGLIYFKRRFHPVMLEMEAAI-
	:

Figure 20. Alignement des séquences protéiques de ActVB de *Streptomyces coelicolor* (Bentley et coll, 2002), DszD de *Rhodococcus erythropolis* (Gray et coll, 1996) et HpaC d'*Escherichia coli* W (Galan et coll, 2000; Prieto et coll, 1994). La séquence de DszD provenant de *Rhodococcus erythropolis* est identique à celle de DszD, issue de *Rhodococcus sp IGTS8*. Les acides aminés strictement conservés sont représentés en rouge. Les séquences de DszD et HpaC présentent respectivement 27 et 30 % d'identité avec celle de ActVB.

Il a donc été proposé que ActVB appartienne à un système d'hydroxylation à deux composants, impliqué dans l'hydroxylation de la DHK. Cependant, son partenaire, l'hydroxylase du couple, restait à identifier.

L'enzyme codée par *actVA-Orf5* partage elle aussi des motifs consensus avec les séquences de DszC de *Rhodococcus sp IGTS8* et de HpaB d'*Escherichia coli* W, les deux monooxygénases présentées précédemment (figure 21) (Galan et coll, 2000; Lei et coll,

Son activité hydroxylase a été identifiée avec la 1,5 dihydroxyanthraquinone (DHAQ, figure 22), un analogue du substrat naturel (la DHK).

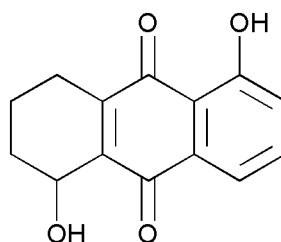


Figure 22. Structure de la DHAQ (1,5 dihydroxyanthraquinone).

Ces résultats préliminaires, ont permis de proposer le système ActVA-ActVB comme un nouveau membre de la famille TC-FDM.

IV But du travail

Les flavoprotéines hydroxylases étaient depuis longtemps considérées comme le paradigme des hydroxylases flavine-dépendantes. Mais récemment, la découverte de la famille TC-FDM a permis de proposer une activité hydroxylase alternative.

Sur les bases du mécanisme catalytique bien connu des flavoprotéines hydroxylases, un schéma réactionnel a été proposé pour expliquer leur mode de fonctionnement. Celui-ci est illustré par la figure 23.

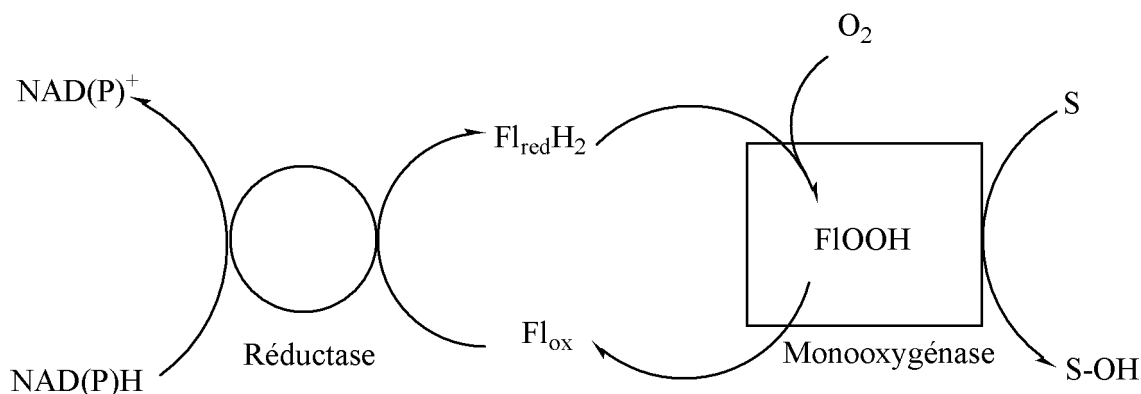


Figure 23. Hypothèse du mécanisme catalytique des hydroxylases flavine-dépendantes à deux composants.

D'après ce schéma, la réductase catalyse la réduction d'une flavine (FAD ou FMN) par le NAD(P)H. La flavine ainsi réduite est transférée à la monooxygénase qui en présence d'oxygène forme un intermédiaire C(4a) hydroperoxyflavine (FLOOH). Celui-ci permet l'hydroxylation d'un substrat spécifique et se transforme en flavine oxydée.

A la différence des flavoprotéines hydroxylases, les activités réductase et hydroxylase sont assurées par deux polypeptides différents. La réduction et l'oxydation de la flavine sont donc réalisées dans deux sites actifs bien distincts. Ceci implique tout d'abord que, dans ce type de système, la double réactivité de la flavine ne peut plus être expliquée par le mécanisme de changement de conformation « in » et « out » décrit pour les flavoprotéines hydroxylases (Entsch et coll, 2005). D'autre part, la séparation des deux activités nécessite une étape supplémentaire correspondant au transfert de la flavine d'une protéine à l'autre. Enfin, la réaction d'hydroxylation nécessite une coordination fine des deux activités.

Le mécanisme réactionnel proposé pour les hydroxylases à deux composants, soulève de multiples questions.

I- Comment s'effectue le transfert de flavine entre la flavine réductase et la monooxygénase ?

Cette question a été abordée très brièvement dans le cas des couples DszC-DszD et HpaB-HpaC. Des expériences indirectes semblent montrer que cette étape est assurée par un phénomène de diffusion passive (Galan et coll, 2000). Cependant, cette notion reste à confirmer et les paramètres qui dictent le sens de ce transfert sont à identifier.

Il se peut également que la flavine soit transférée d'une enzyme à l'autre via la formation d'un complexe protéique. En effet, ce phénomène a été mis en évidence pour la luciférase, une hydroxylase à deux composants, impliquée dans le phénomène de bioluminescence (Duane et coll, 1975; Jeffers et coll, 2003). Bien que ce système n'appartienne pas à la famille TC-FDM, il semblait tout de même intéressant de tester cette hypothèse.

II- Quel est le mécanisme d'activation de l'oxygène ?

La formation d'un intermédiaire C(4a) hydroperoxyflavine a été proposée pour expliquer cette étape. Cependant, la présence d'une telle espèce n'a jamais été mise en évidence pour ces systèmes. Il est donc nécessaire de vérifier cela. De plus, il semble important d'identifier les rôles que jouent les deux enzymes dans cette étape et en particulier, de déterminer si, outre sa fonction génératrice de flavine réduite, la flavine réductase est nécessaire à cette activation.

III- Comment les activités des deux enzymes se coordonnent elles et comment sont-elles régulées ?

Nous avons vu que pour les flavoprotéines hydroxylases, les deux activités flavine réductase et hydroxylase sont regroupées au sein d'un même site actif. Elles sont coordonnées très finement par la dynamique de l'enzyme qui oscille entre trois conformations. Qu'en est il lorsque ces deux activités sont réalisées par deux protéines différentes ? D'autre part, il est maintenant établi que le substrat à hydroxyler a le pouvoir de réguler l'activité des flavoprotéines hydroxylases (Husain et coll, 1979). Est-ce que les hydroxylases à deux composants sont régulées de la même manière ?

L'objet de notre étude, le système ActVA-ActVB de *Streptomyces coelicolor*, est un modèle tout à fait adapté pour répondre à ces questions.

Comme cela a été présenté précédemment, au début de mon projet, l'activité flavine réductase de ActVB avait été caractérisée en détail et son partenaire, la monooxygénase nommée ActVA, venait d'être identifié.

Le but de mon travail a été d'étudier le mécanisme catalytique du système ActVA-ActVB afin de comprendre plus en détail le fonctionnement de cette nouvelle famille d'hydroxylases originales.

Le facteur limitant de ce type d'étude est bien souvent l'obtention de quantités suffisantes de protéines pures. C'est pourquoi il a fallu commencer par mettre au point un protocole de purification efficace et rapide. A ce titre, le **chapitre I** rapporte les purifications et les caractérisations biochimiques de ActVA et de ActVB sous sa forme apoprotéine.

Le **chapitre II** décrit les travaux que nous avons réalisés pour comprendre le mécanisme de transfert de flavine. Partant de l'hypothèse d'un transfert par diffusion passive, il était tout d'abord intéressant d'évaluer quantitativement l'affinité du FMN vis-à-vis des deux protéines. Comme ce phénomène implique les formes oxydée et réduite de la flavine, cette étude a été réalisée pour les deux états rédox du FMN. De plus, afin de vérifier que ce transfert ne nécessitait pas de complexe entre ActVA et ActVB, leur interaction a été étudiée.

Le **chapitre III** présente l'étude du mécanisme d'activation de l'oxygène par le système ActVA-ActVB. Cette partie rapporte l'identification spectroscopique de

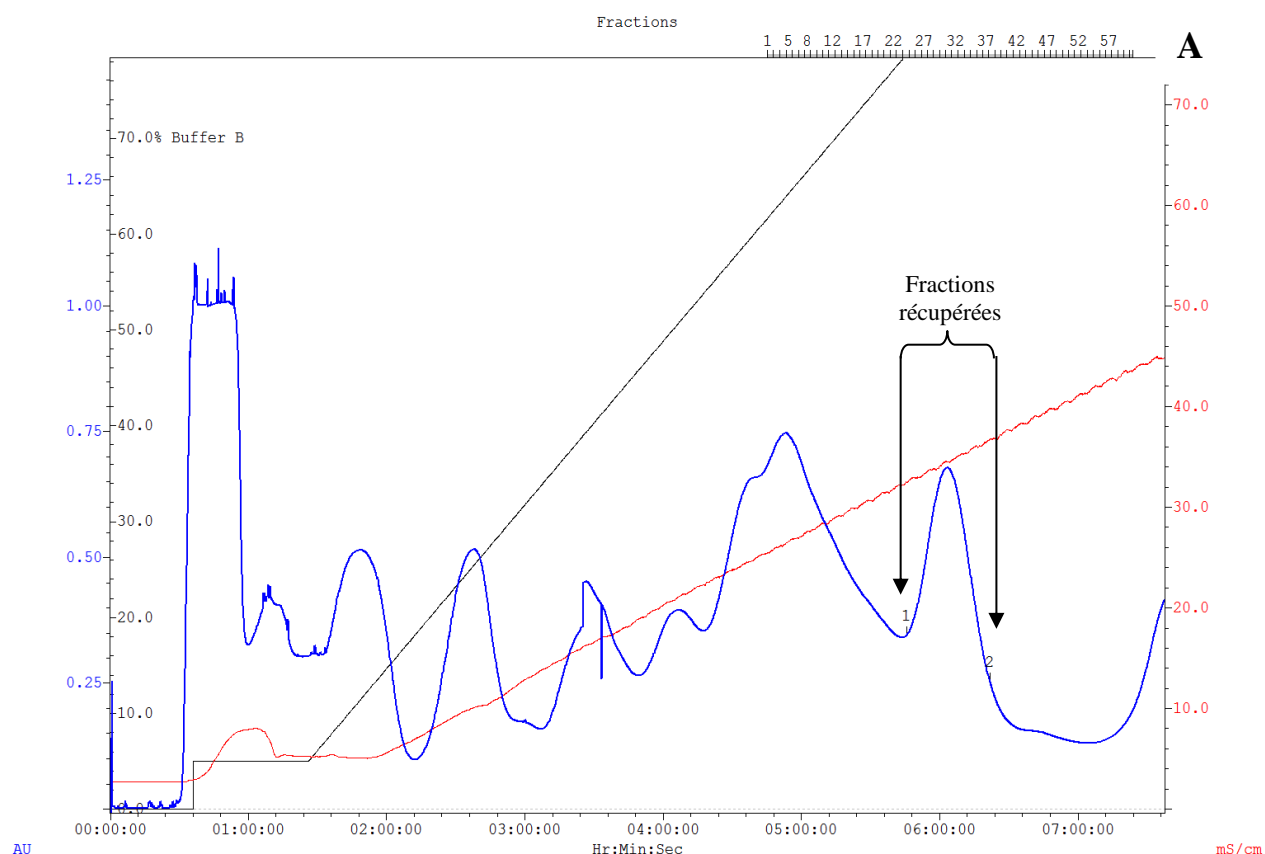
l'intermédiaire flavinique formé lorsque les complexes ActVA:FMN_{red} et ActVA:ActVB:FMN_{red} sont mis en présence d'oxygène. La formation d'une telle espèce a également été étudiée dans des conditions d'état stationnaire en présence de ActVA et de ActVB.

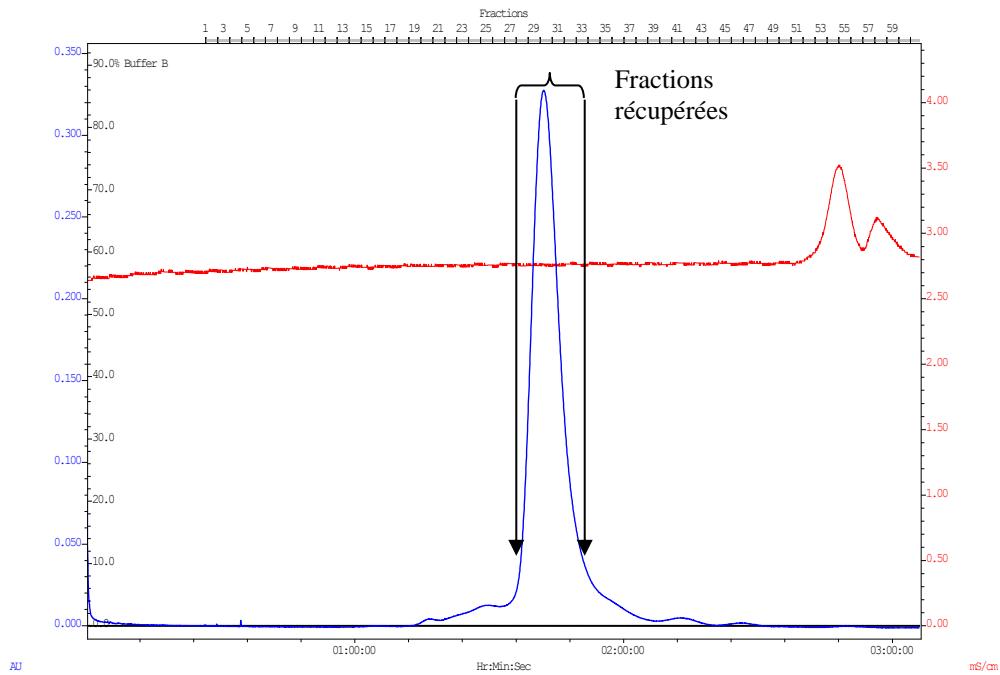
Le **chapitre IV** décrit la caractérisation de l'activité hydroxylase de ce système en présence de son substrat naturel, une quinone nommée DHK et de deux analogues structuraux, NNM-A et NNM-D. Les différents produits de réaction ont été identifiés par spectrométrie de masse et caractérisés par spectroscopie UV-visible. Ces espèces ont été quantifiées et l'efficacité du système a été évaluée en terme de rendement réactionnel. Ce dernier a été étudié en fonction de plusieurs paramètres afin de trouver les conditions dans lesquelles l'efficacité du système était optimale. A ce titre, l'influence des concentrations de ActVA et d'oxygène a été étudiée. Les résultats étonnants que nous avons obtenus, nous ont finalement conduit à tester l'effet de l'état rédox des trois quinones substrats sur le rendement réactionnel. L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence une spécificité rédox du système ActVA-ActVB pour ses substrats. Finalement, l'activité réductase de la forme flavoprotéique de ActVB (ActVB:FMN_c) vis-à-vis de ce type de molécules a été caractérisée brièvement.

I Purification et caractérisation biochimique du produit du gène *actVA* - *Orf5* et préparation d'apoActVB

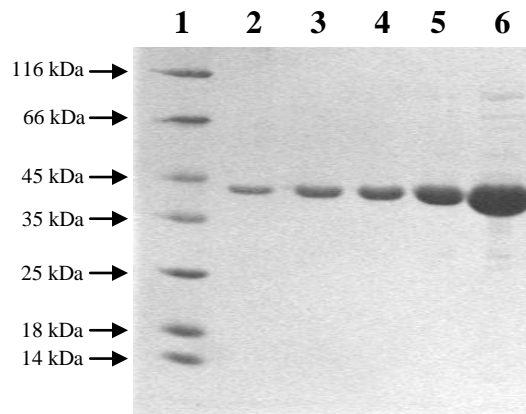
I.1 Purification et caractérisation de ActVA-Orf5

Les détails des méthodes utilisées pour cloner, surexprimer et purifier ActVA-Orf5 sont décrits dans la partie matériels et méthodes. Classiquement, les extraits protéiques solubles sont chargés sur une colonne échangeuse d'anions. La séparation et l'élution des protéines s'effectuent grâce à un gradient de NaCl (figure 1A). Après l'analyse par SDS-PAGE des différents pics d'élution, une bande majoritaire de 39 kDa, correspondant à ActVA-Orf5, est observée dans les fractions 24 à 38. D'après les valeurs de conductivité de la figure 1A, elle est éluée entre 350 et 420 mM de NaCl. Les fractions contenant ActVA-Orf5 sont rassemblées et purifiées sur une colonne de tamisage moléculaire (figure 1B). Ces deux étapes chromatographiques nous permettent d'obtenir une solution de ActVA-Orf5 pure à plus de 95 %, comme en atteste le gel SDS-PAGE présenté en figure 1C.





B



C

Figure 1. Purification de ActVA-Orf5.

A : chromatogramme de la première étape de purification correspondant à la chromatographie échangeuse d'anions Q-Sepharose XL.

B : chromatogramme de la deuxième étape de purification correspondant à la chromatographie par tamisage moléculaire Superdex 200.

C : gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 % de la solution de ActVA-Orf5 purifiée. Piste 1 : marqueurs de masse moléculaire ; pistes 2 à 6 : 0,4 ; 0,8 ; 1 ; 2 et 6 μg de ActVA-Orf5.

La détermination de la masse moléculaire de la protéine purifiée par spectrométrie de masse (39, 715 kDa) ainsi qu'un séquençage de son extrémité N-terminale (SEDTHT), confirment que nous avons bien isolé le produit du gène *actVA-Orf5*, amputé de sa méthionine N-terminale. De plus, aucune protéolyse n'a été détectée durant cette purification.

ActVA-Orf5, que nous nommerons dorénavant ActVA pour plus de simplicité, ne contient apparemment aucun cofacteur particulier. Le spectre UV-visible de la solution purifiée ne contient en effet qu'une seule bande d'absorption centrée à 280 nm (figure 2).

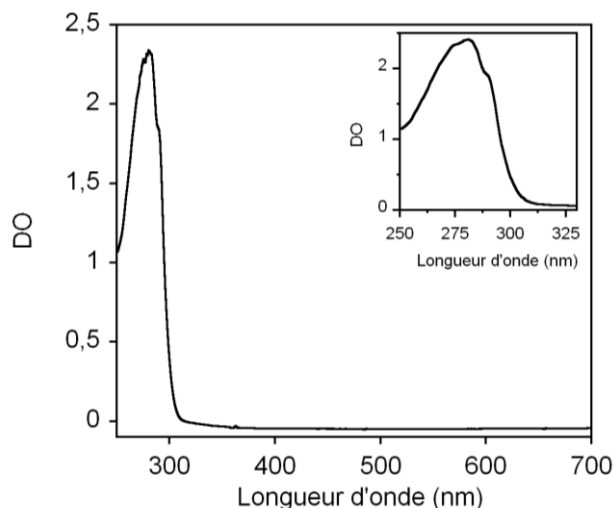


Figure 2. Spectre UV-visible de ActVA-Orf5 (3,4 mg/mL), en solution dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

D'autre part, des expériences de chromatographie par tamisage moléculaire effectuées sur une colonne Superdex 200 calibrée ont permis de démontrer que ActVA possède une structure quaternaire dimérique (Filisetti, 2004).

En sortie de colonne échangeuse d'anions, ActVA a tendance à précipiter. La stabilité de cette protéine semble donc être affectée par la présence de NaCl. La figure 3 illustre l'évolution du spectre UV-visible de ActVA suite à sa dilution d'un facteur 2 dans une solution tamponnée en présence (A) ou en absence (B) de NaCl. L'ajout de sel (concentration finale 250 mM) provoque une augmentation rapide de la DO dans le domaine du visible. Plus la longueur d'onde est faible, plus l'amplitude de cet effet est importante. Ce phénomène de diffusion de la lumière est caractéristique d'une agrégation protéique. Il n'est d'ailleurs pas observé en absence de sel. Le NaCl déstabilise ActVA et entraîne sa précipitation. C'est pourquoi, toutes les expériences ultérieures à la purification, sont réalisées dans du tampon Tris-HCl 10-50 mM pH 7,6 dépourvu de sels additionnels.

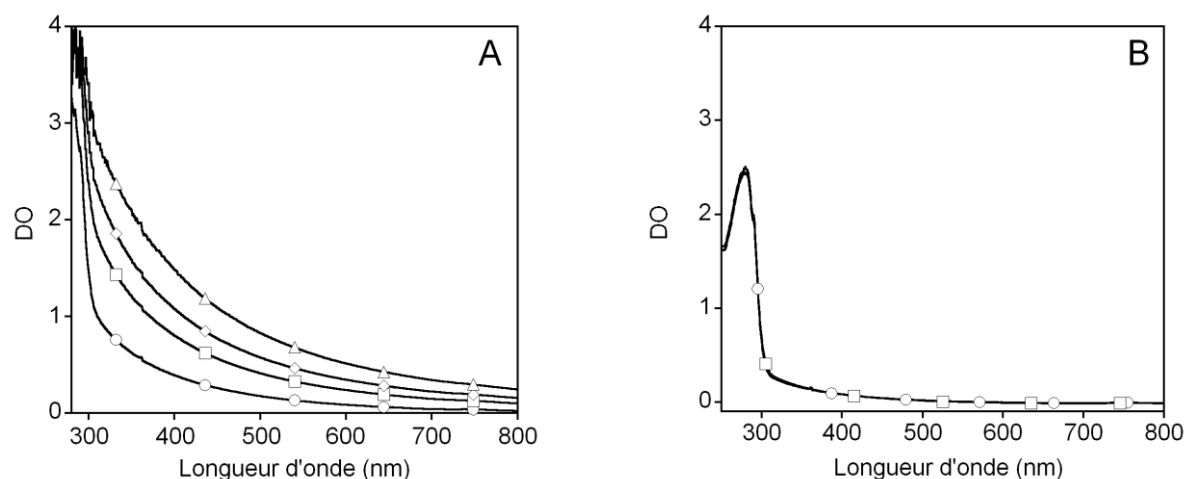


Figure 3. Sensibilité de ActVA au NaCl. 50 μ L de ActVA (6,8 mg/mL) sont dilués par 2 dans un même volume de tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,6 en présence (A) ou en absence (B) de NaCl à une concentration finale de 250 mM. Les spectres sont enregistrés : 1 (○), 2 (□), 3 (◇) et 5 min (△) après la dilution (A) ; 30 s (○) et 30 min (□) après la dilution (B).

I.2 Préparation de l'apoActVB

Il a été montré qu'à la fin de sa purification, ActVB contient une molécule de FMN fortement fixée à sa chaîne polypeptidique. L'activité flavine réductase de ActVB ne dépend pas de cette flavine et son rôle est encore inconnu (Filisetti et coll, 2003). Durant nos travaux, nous avons été amenés à étudier l'équilibre de fixation entre ActVB et le FMN. Ce type d'étude nécessite l'emploi de ActVB dans sa forme apoenzyme (sans FMN endogène). C'est la raison pour laquelle un protocole de déflavination de ActVB a été mis au point.

Il a été rapporté que le traitement de certaines flavoprotéines par un mélange de KBr et d'urée permettait la dissociation de leur cofacteur (Hefti et coll, 2003). Cette méthode a donc été employée dans le cas de ActVB. La présence d'une étiquette poly-histidine dans sa partie C-terminale a permis de réaliser ce traitement sur une colonne Ni-NTA. La protéine (2 mg) est tout d'abord chargée sur la colonne puis traitée par 1,5 volumes de colonne d'un mélange KBr/Urée (concentrations respectives 2 M). Durant cette étape, ActVB perd la totalité de son cofacteur mais reste fortement accrochée à la matrice Ni-NTA. Les traces de KBr et d'urée sont ensuite éliminées par lavage, et la protéine est enfin éluée.

Afin d'évaluer la fonctionnalité de la forme apoprotéique de ActVB ainsi préparée, les paramètres cinétiques de cette dernière ont été déterminés en présence de quantités croissantes de FMN (figure 4).

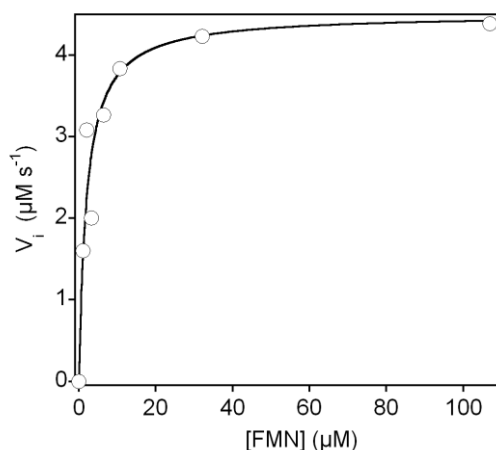


Figure 4. Activité flavine réductase de ActVB sous sa forme apo. Un mélange contenant 200 μM de NADH dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, est incubé à 18°C en présence de quantités variables de FMN (0 – 55 μM). La réaction est initiée par l'ajout de 1 μg d'apoActVB et l'oxydation du NADH est suivie à 340 nm par spectroscopie UV-visible. La vitesse initiale de cette oxydation est déterminée pour chaque concentration de FMN. L'ajustement des données est réalisé avec une hyperbole de saturation. Un K_m de $2,0 \pm 0,6$ μM et un k_{cat} de $8,7 \pm 0,7$ s⁻¹ sont obtenus.

Les paramètres cinétiques de l'apoenzyme sont similaires à ceux qui ont été rapportés pour l'enzyme contenant de 0,1 à 0,5 équivalents de FMN endogène ($k_{cat} = 9,2$ s⁻¹ et $K_m = 1$ μM) (Filisetti et coll, 2003). Il semble donc que ce traitement permette de dissocier la flavine de ActVB sans altérer son activité flavine réductase. Par conséquent, les expériences détaillées dans les chapitres suivants ont été réalisées avec cette solution d'apoActVB.

I.3 Conclusion

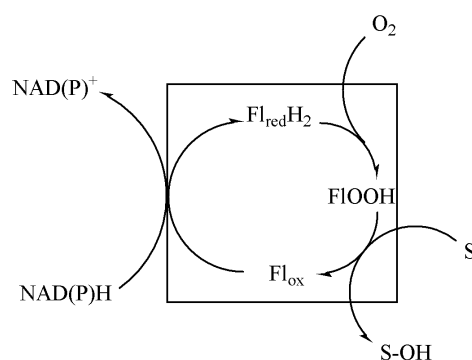
Afin de pouvoir étudier l'enzyme ActVA, un protocole de purification efficace et rapide a été mis au point. Une première étape de chromatographie échangeuse d'anions suivie d'une deuxième étape de tamisage moléculaire nous permettent d'obtenir une quantité satisfaisante de ActVA (~ 50 mg pour 10 L de culture) à une pureté supérieure à 95 %. L'analyse de cette préparation protéique par spectrométrie de masse et par spectroscopie UV-visible montre clairement que ActVA n'est pas protéolysée durant la purification et qu'elle ne semble pas contenir de cofacteur particulier. Par ailleurs, cette enzyme présente une sensibilité importante au NaCl. Il semble donc nécessaire de la conserver en solution dans un tampon dépourvu de sels additionnels pour éviter son agrégation.

En parallèle, la forme apoprotéine de ActVB a été préparée à l'aide d'un traitement de KBr et d'urée. Le protocole que nous avons mis au point permet d'extraire très efficacement le FMN endogène contenu dans ActVB sans altérer son activité flavine réductase.

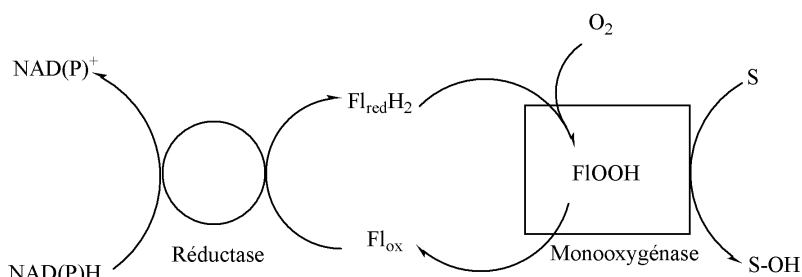
En conclusion, ces deux protocoles nous permettent d'obtenir ActVA et apoActVB dans des quantités et à un degré de pureté tout à fait satisfaisants pour réaliser la caractérisation du mécanisme enzymatique du système ActVA-ActVB.

II Transfert de FMN entre ActVA et ActVB

Dans le cas des flavoprotéines hydroxylases, la réaction d'hydroxylation est catalysée en deux étapes par une seule enzyme bifonctionnelle. La flavine est tout d'abord réduite en présence de NAD(P)H puis oxydée en hydroperoxyflavine (FLOOH), une espèce capable d'hydroxyler efficacement un substrat (schéma 1A) (Palfey et coll, 1995). Dans le cas des hydroxylases à deux composants, telles que ActVA-ActVB, ces deux étapes sont catalysées séparément par deux enzymes distinctes. La flavine, une fois réduite par la réductase, doit donc être transférée à la monooxygénase afin de permettre l'hydroxylation du substrat (schéma 1B).



A



B

Schéma 1. Mécanismes catalytiques proposés pour les flavoprotéines hydroxylases (A) et les monooxygénases à deux composants (B).

Un mécanisme de transfert a été proposé dans le cas de la NADPH:FMN oxydoréductase / luciférase de *Vibrio harveyi*, un système à deux composants impliqué dans le phénomène de bioluminescence (Jeffers et coll, 2003; Jeffers et coll, 2001; Lei et coll, 1998; Meighen, 1991). La réductase est une flavoprotéine capable de catalyser la réduction de son FMN cofacteur en présence de NADPH. Le FMN réduit ainsi formé est transféré à la luciférase via la formation d'un complexe luciférase/réductase puis utilisé pour catalyser l'émission de photons verts caractéristiques de la bioluminescence (Jeffers et coll, 2003; Meighen, 1991).

Pour les hydroxylases à deux composants telles que ActVA-ActVB qui ne possèdent pas d'homologie de séquence avec le système NADPH:FMN oxydoréductase/Luciférase, ce mécanisme de transfert est encore inconnu.

Afin d'élucider le mécanisme de transfert du FMN entre ActVA et ActVB, les constantes d'équilibre de dissociation (K_d) des FMN_{ox} et FMN_{red} vis-à-vis de ActVA et ActVB ont été déterminées.

II.1 Interactions du FMN avec ActVA et ActVB

Avant de décrire nos résultats, rappelons quelques notions sur les équilibres de fixation.

Si l'on considère l'équilibre de fixation d'un ligand L sur une protéine P suivant :



Il peut être caractérisé par une constante d'équilibre de dissociation nommée K_d :

$$K_d = \frac{[P] \times [L]}{[PL]} \quad \text{Equation 15}$$

[P], [L] et [PL] étant les concentrations à l'équilibre de protéine libre, de ligand libre et de complexe protéine-ligand, respectivement.

Une des manières les plus courantes de déterminer expérimentalement la valeur du K_d , consiste à étudier la variation de la quantité de complexe protéine-ligand (PL) en fonction de celle de ligand libre (L) lorsque l'équilibre est réalisé. Dans le cas où la protéine possède un seul site de fixation pour le ligand, cette variation est décrite par l'équation d'une hyperbole de saturation :

$$[PL] = \frac{[P_{tot}] \times [L]}{K_d + [L]} \quad \text{Equation 16}$$

où $[P_{tot}]$ est la concentration de protéine totale. L'ajustement des données expérimentales ($[PL] = f[L]$) par l'équation 16 nous permet de déterminer la valeur du K_d . En pratique il est donc nécessaire de pouvoir quantifier précisément [L] et [PL] pour déterminer un K_d .

Dans certains cas, les paramètres physicochimiques de la protéine et de son ligand varient significativement lorsqu'ils forment un complexe. Parmi eux, nous pouvons citer les

paramètres de fluorescence tels que l'intensité et le λ_{\max} du spectre d'émission, l'anisotropie et le déclin de fluorescence. Nous pouvons citer également les paramètres d'absorption de la lumière UV-visible tels que l'intensité et le λ_{\max} du spectre. Ceux-ci peuvent être utilisés pour mettre en évidence la formation d'un complexe protéine/substrat d'un point de vue qualitatif. Cependant, seules les variations d'intensités de fluorescence et d'absorbance peuvent être utilisées pour étudier l'équilibre de fixation de manière quantitative. Ce sont en effet les seuls paramètres qui varient de façon linéaire par rapport aux quantités de complexe PL et de ligand libre L présentes à l'équilibre (Ladokhin et coll, 2000). Ils peuvent donc nous donner directement accès à ces valeurs via un simple coefficient de proportionnalité.

II.1.A Etude de la fixation de la flavine suivie par spectroscopie UV-visible

Dans le but de vérifier si la formation des complexes ActVB:FMN_{ox} et ActVA:FMN_{ox} est observable par spectroscopie UV-visible, le spectre du FMN_{ox} seul a été comparé à ceux obtenus en présence d'un excès de ActVB puis de ActVA (figure 5).

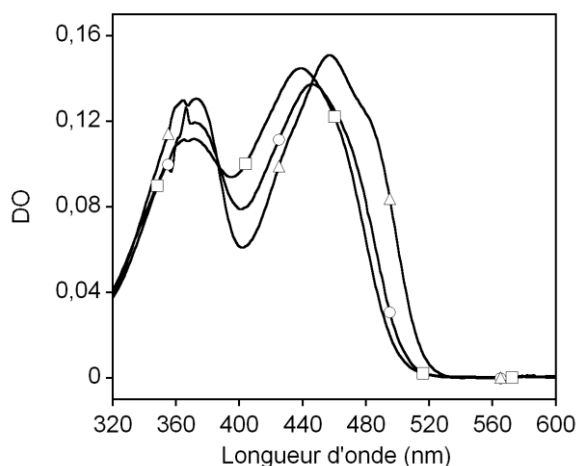


Figure 5. Spectres UV-visibles du FMN_{ox} (11 μ M) seul (○), en présence de 200 μ M de ActVA (□), ou de 40 μ M de ActVB (△), en solution dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6 à 25°C.

Le spectre UV-visible du FMN_{ox} varie lorsque l'une des deux protéines est ajoutée en excès. La différence la plus importante se trouve au niveau de la bande visible de basse énergie. Lorsque le FMN_{ox} est seul en solution, cette bande est centrée sur 445 nm. En présence de ActVA ou ActVB, elle est déplacée respectivement vers 437 et 457 nm. De plus, son intensité varie. Le coefficient d'extinction molaire du FMN_{ox} seul est de 12,4 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ alors qu'en

présence de ActVA ou de ActVB, il est de 13,0 et 13,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, respectivement. Ce phénomène a été fréquemment observé avec les flavoenzymes (Gadda et coll, 1998; Macheroux et coll, 1996; Niviere et coll, 1998). Il est caractéristique d'une interaction entre le FMN_{ox} et l'enzyme. Ces observations montrent que ActVA et ActVB ont la capacité de fixer le FMN_{ox} .

Les variations d'intensité d'absorbance ont été utilisées afin d'étudier quantitativement la fixation du FMN_{ox} sur ActVA et ActVB.

II.1.A.a Etude de la fixation du FMN_{ox} sur ActVA

Comme le montre la figure 6A, la titration spectrophotométrique du FMN_{ox} en présence de quantités croissantes de ActVA en aérobiose, entraîne une augmentation progressive de l'intensité de la bande d'absorption du FMN_{ox} et un décalage de son λ_{max} de 445 vers 437 nm. De plus, cette évolution fait apparaître deux points isobestiques à 388 et 458 nm.

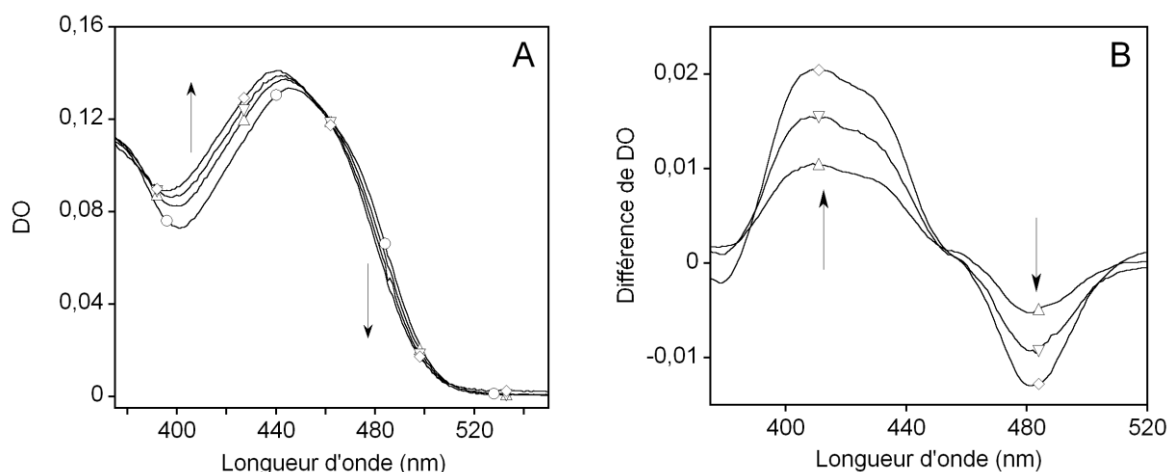


Figure 6. Titration spectrophotométrique du FMN_{ox} par ActVA. Spectres UV-visibles du FMN_{ox} à 10 μM , seul (\circ) et en présence de 20 (\triangle), 39 (∇) et 91 μM (\diamond) de ActVA dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6 à 18°C. (A) spectres bruts, (B) spectres de différences entre une solution de FMN_{ox} contenant une quantité donnée de ActVA et une solution de FMN_{ox} seul. Les flèches indiquent le sens d'évolution du spectre lorsque la protéine est ajoutée au mélange.

Ce phénomène témoigne de la formation progressive d'un complexe ActVA: FMN_{ox} . La présence de deux points isobestiques situés à 388 et 458 nm, indique qu'il n'existe pas de forme intermédiaire entre les états libre et lié du FMN_{ox} lors de cette titration. Le spectre initial et le spectre final correspondent respectivement au FMN_{ox} libre (0 % de complexe ActVA: FMN_{ox}) et totalement fixé à ActVA (100 % de complexe ActVA: FMN_{ox}). Selon la loi de Beer-Lambert, la différence d'intensité d'absorbance entre ces deux spectres (figure 6B, \diamond) est proportionnelle à la quantité totale de complexe ActVA: FMN_{ox} . Ceci nous permet de déterminer la fraction de complexe formé à partir de la différence d'absorbance

entre un spectre enregistré au cours de la titration et le spectre initial (figure 6B). La valeur de cette fraction nous permet d'en déduire la concentration des différentes espèces présentes à l'équilibre (cf matériels et méthodes).

La figure 7 illustre la variation de la concentration de complexe ActVA:FMN_{ox} (FMN_{ox} lié) en fonction de la concentration de ActVA libre.

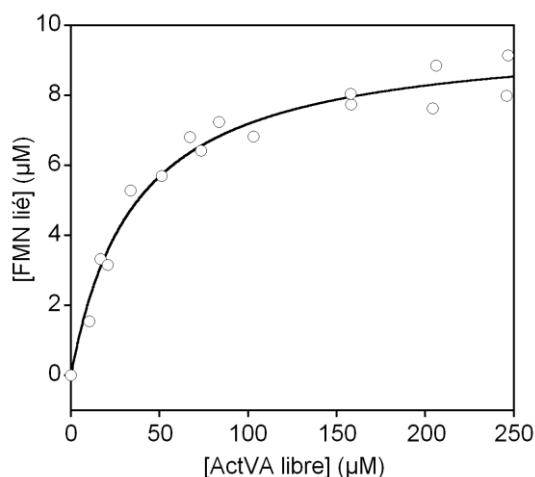


Figure 7. Détermination de la constante de dissociation du FMN_{ox} vis-à-vis de ActVA par spectroscopie. Les concentrations de FMN_{ox} lié, calculées à partir des variations du spectre UV-visible du FMN_{ox} à 408 nm et à 18°C, sont représentées en fonction de la concentration de ActVA libre. L'ajustement de ces données est réalisé avec une hyperbole de saturation (équation 16). Le K_d obtenu est de 36 ± 5 μM.

Ces données expérimentales peuvent être ajustées avec la fonction hyperbole donnée par l'équation 16. Il existe donc un équilibre de fixation entre ActVA et le FMN_{ox}. D'après les paramètres de l'ajustement, un K_d de 36 ± 5 μM est déterminé.

II.1.A.b Etude de la fixation du FMN_{ox} sur ActVB

i Equilibre de fixation entre ActVB et FMN_{ox}

Comme dans le cas de ActVA, la titration spectrophotométrique du FMN_{ox} en présence de quantités croissantes de ActVB en aérobiose a été réalisée. Celle-ci entraîne une augmentation progressive de l'intensité de la bande d'absorption du FMN_{ox} et un décalage de son λ_{\max} de 445 vers 457 nm (figure 8). De nouveau, cette évolution fait apparaître deux points isobestiques (385 et 436 nm), ce qui prouve qu'il n'existe pas de forme intermédiaire entre les états libre et lié du FMN_{ox} lors de cette titration.

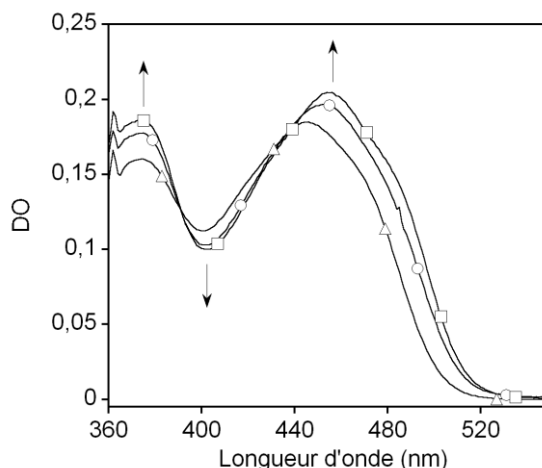


Figure 8. Titration spectrophotométrique du FMN_{ox} par ActVB. Spectres UV-visibles du FMN_{ox} à 15 μM, seul (\triangle) et en présence de 17,6 (\circ) et 44 μM (\square) de ActVB dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6 à 18°C. Les flèches indiquent le sens d'évolution du spectre du FMN_{ox} lorsque ActVB est ajoutée au mélange.

Les quantités des différentes espèces présentes à l'équilibre sont déterminées à partir des valeurs d'absorbance à 490 nm obtenues après chaque ajout de ActVB comme nous l'avons décrit dans la section matériels et méthodes. La concentration de FMN_{ox} lié est représentée en fonction de la concentration de ActVB libre et les données sont ajustées avec l'équation 16 (figure 9).

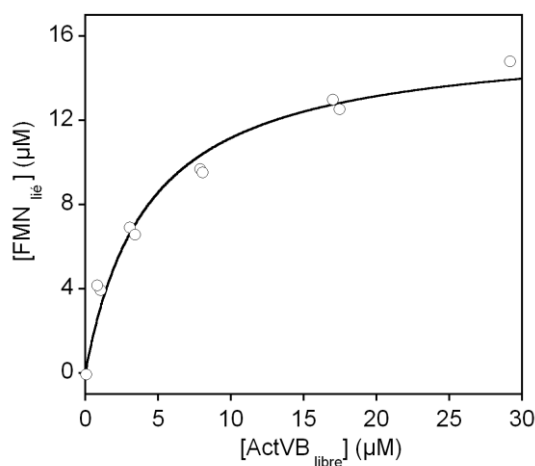


Figure 9. Détermination de la constante de dissociation du FMN_{ox} vis-à-vis de ActVB par spectroscopie. Les concentrations de FMN_{ox} lié, calculées à partir des variations du spectre UV-visible du FMN_{ox}, mesurées à 480 nm et à 18°C, sont représentées en fonction de la concentration de ActVB libre. L'ajustement de ces données est réalisé avec une hyperbole de saturation (équation 16).

Le K_d obtenu est de $4,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$.

Ce résultat confirme l'existence d'un équilibre de fixation entre ActVB et le FMN_{ox}. D'après les paramètres de l'ajustement, un K_d de $4,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ est déterminé.

ii Equilibre de fixation entre ActVB et FMN_{red}

A la différence du FMN_{ox}, le FMN_{red} (FMN réduit) ne possède pas de spectre UV-visible très intense. La valeur de la constante de dissociation du FMN_{red} vis-à-vis de ActVB n'a donc pas pu être déterminée par cette méthode. Par contre, le K_d peut être obtenu grâce aux caractéristiques spectrales particulières que possède le FMN_{red} lorsqu'il est complexé à ActVB en présence de NAD⁺. En effet, il a été rapporté que la formation du complexe FMN_{red}:NAD⁺ au sein du site actif de ActVB entraîne l'apparition d'une large bande d'absorption située entre 500 et 800 nm (Filisetti et coll, 2003). Cette bande est caractéristique d'un transfert de charge entre le NAD⁺ et le FMN_{red} (Massey et coll, 1970). Des études de cristallographie aux rayons X réalisées sur FeR, une NADPH:FMN oxydoréductase homologue à ActVB, illustrent très clairement l'origine structurale de cette signature spectroscopique (Chiu et coll, 2001). Ces travaux présentent l'interaction entre le noyau nicotinamide du NADP⁺ (bleu) et le noyau isoalloxazine du FMN_{red} (rouge), conduisant à la formation de cette bande de transfert de charge (figure 10).

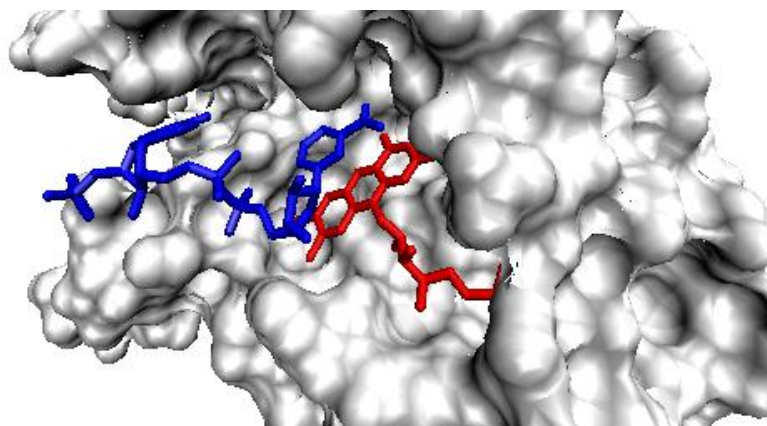


Figure 10. Structure du site actif de FeR d'*Archaeoglobus fulgidus* en présence du FMN_{ox} (rouge) et du NADP⁺ (bleu) (Chiu et coll, 2001).

Cette signature spectroscopique particulière du complexe FMN_{red}:NAD⁺:ActVB a donc été utilisée pour mesurer l'affinité du FMN_{red} vis-à-vis du complexe ActVB:NAD⁺. Pour éviter l'oxydation du FMN_{red} par l'oxygène, cette expérience a été réalisée en boîte à gants sous atmosphère anaérobie. La figure 11 illustre l'évolution de cette bande de transfert de charge lorsque des quantités croissantes de FMN_{red} sont ajoutées à une solution de ActVB contenant un excès de NAD⁺.

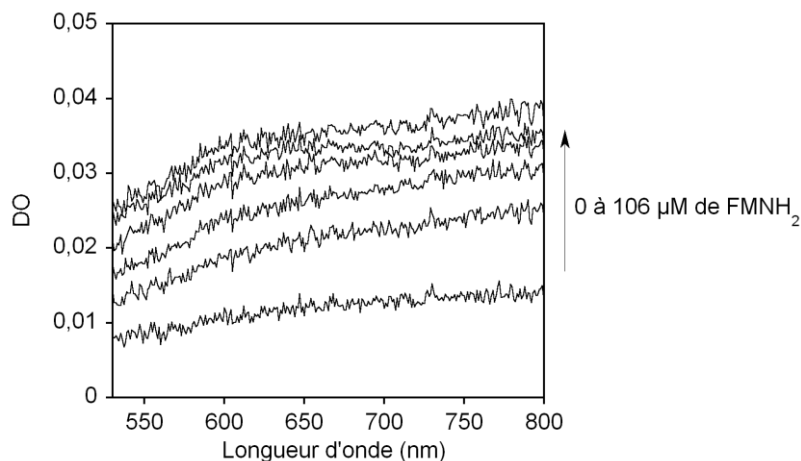


Figure 11. Titration spectrophotométrique du complexe $\text{NAD}^+:\text{ActVB}$ par le FMN_{red} . ActVB ($24 \mu\text{M}$) en solution dans 2 mM de NAD^+ , 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, est incubée à 18°C en anaérobiose, en présence de quantités croissantes de FMN_{red} . De bas en haut sont représentés les spectres du mélange contenant 10, 19, 28, 45, 53 et $106 \mu\text{M}$ de FMN_{red} (concentrations finales).

L'intensité de cette bande de transfert de charge augmente en fonction de la quantité de FMN_{red} ajoutée au mélange. Un complexe $\text{FMN}_{\text{red}}:\text{NAD}^+:\text{ActVB}$ est donc formé. Il peut être quantifié à partir des valeurs d'absorbance à 680 nm obtenues après chaque ajout de FMN_{red} (cf matériel et méthodes). La concentration de ActVB liée ($\text{FMN}_{\text{red}}:\text{NAD}^+:\text{ActVB}$) ainsi obtenue, est représentée en fonction de celle de FMN_{red} libre et les données sont ajustées avec l'équation 16 (figure 12).

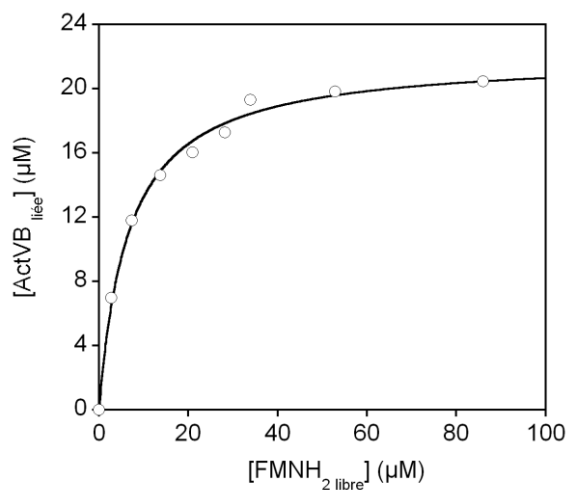


Figure 12. Détermination de la constante de dissociation du FMN_{red} vis-à-vis de ActVB par spectroscopie. Les concentrations de ActVB liée, calculées à partir des variations de la bande de transfert de charge à 680 nm , mesurées à 18°C et en anaérobiose, sont représentées en fonction de la concentration du FMN_{red} libre. L'ajustement de ces données est réalisé avec une hyperbole de saturation. Le K_d obtenu est de $6,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$.

Il existe un équilibre de fixation entre ActVB et le FMN_{red} . D'après les paramètres de l'ajustement, un K_d de $6,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ est déterminé.

II.1.B Etude de la fixation de la flavine suivie par fluorescence

Les expériences de spectroscopie UV-visible que nous avons réalisées nous ont permis d'apprécier les affinités du FMN_{ox} pour ActVB et ActVA, et celle du FMN_{red} pour ActVB, en présence de NAD⁺. Cependant, pour des raisons de sensibilité, il n'est pas possible d'observer l'interaction entre ActVA et le FMN_{red} par ce type de spectroscopie. C'est pourquoi nous avons étudié ce phénomène par une technique alternative. Comme ActVA contient 10 tryptophanes et 8 tyrosines, il nous a semblé intéressant d'essayer la spectroscopie de fluorescence.

Afin de vérifier que cette technique est bien adaptée à ce type d'expérience, nous avons étudié l'équilibre de fixation entre le FMN_{ox} et ActVA par spectroscopie de fluorescence puis comparé les résultats de cette expérience à ceux obtenus par spectroscopie UV-visible.

II.1.B.a Fixation du FMN_{ox} sur ActVA

La figure 13A illustre les variations du spectre de fluorescence de ActVA ($\lambda_{\text{excitation}} = 295 \text{ nm}$) en fonction de la concentration de FMN_{ox}. La présence du cofacteur entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence ainsi qu'un décalage du λ_{max} du spectre d'émission vers les faibles longueurs d'onde. Comme nous l'avons déjà expliqué (cf matériels et méthodes, p 42), le FMN_{ox} absorbe à la longueur d'excitation ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) ainsi que dans la zone d'émission de fluorescence de ActVA ($300 < \lambda_{\text{em}} < 400 \text{ nm}$). Ces caractéristiques spectrales particulières du FMN_{ox} entraînent une diminution de la fluorescence de ActVA sans qu'il y ait formation d'un complexe ActVA:FMN_{ox}. Ce phénomène, appelé *filtre interne*, peut être quantifié précisément en calculant avec la loi de Beer-Lambert la quantité de lumière absorbée par le FMN_{ox} lors de l'excitation et de l'émission.

Afin d'étudier uniquement les variations de fluorescence intrinsèques à ActVA lorsqu'elle fixe le FMN_{ox}, nos valeurs expérimentales ont été corrigées de ce filtre interne, selon la méthode décrite dans la section matériels et méthodes. La figure 13B présente le résultat de cette correction. L'addition de quantités croissantes de FMN_{ox} entraîne un « quenching » de la fluorescence de ActVA sans provoquer de décalage de λ_{em} ($< 1 \text{ nm}$). Ce phénomène indique que le FMN_{ox} se fixe à proximité d'un ou plusieurs tryptophanes contenus dans ActVA.

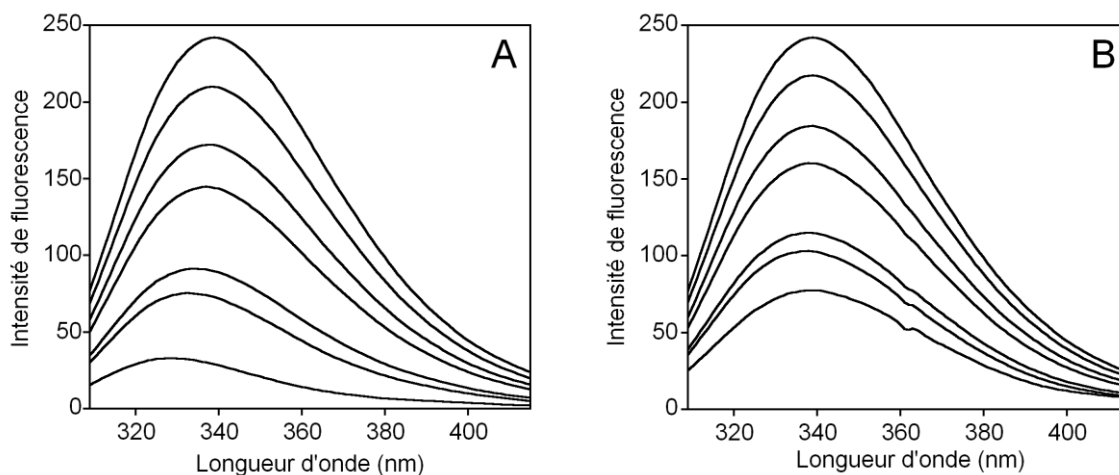


Figure 13. Titration spectrofluorimétrique de ActVA par FMN_{ox}. Le spectre de fluorescence de ActVA (36 μM) en solution dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, est mesuré en aérobiose en présence de quantités croissantes de FMN_{ox} (de haut en bas : 0, 12, 24, 36, 85, 121 et 360 μM) à 18°C. (A) spectres de fluorescence bruts, (B) spectres de fluorescence corrigés, du filtre interne provoqué par la présence de FMN_{ox}.

De la même manière que pour les expériences de titration suivies par spectroscopie UV-visible, le spectre initial et le spectre final correspondent respectivement à la forme libre de ActVA (0 % de complexe ActVA:FMN_{ox}) et à la forme totalement complexée au FMN_{ox} (100 % de complexe ActVA:FMN_{ox}). Dans nos conditions expérimentales, la différence d'intensité de fluorescence entre ces deux spectres est proportionnelle à la quantité totale de complexe ActVA:FMN_{ox} (Ladokhin et coll, 2000). Ceci nous permet de déterminer la fraction de complexe formé à partir de la différence d'intensité de fluorescence entre un spectre enregistré au cours de la titration et le spectre initial. Cela nous permet également d'en déduire la concentration des différentes espèces présentes à l'équilibre (cf matériels et méthodes).

D'après la valeur d'intensité de fluorescence corrigée mesurée à 338 nm, les quantités de ActVA liée présentes à l'équilibre sont déterminées puis représentées en fonction du FMN_{ox} libre (figure 14).

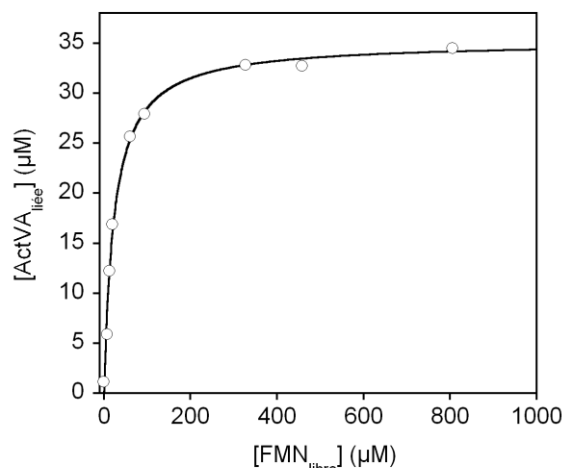


Figure 14. Détermination de la constante de dissociation du FMN_{ox} pour ActVA par spectrofluorimétrie. Les concentrations de ActVA liée, calculées à partir des variations du spectre de fluorescence de ActVA à 339 nm, mesuré à 18°C, sont représentées en fonction de la concentration de FMN_{ox} libre. L'ajustement de ces données est réalisé avec une hyperbole de saturation. Le K_d obtenu est de $24 \pm 3 \mu\text{M}$.

L'ajustement de ces données par une fonction hyperbole (équation 16) nous permet d'obtenir une valeur de K_d de $24 \pm 3 \mu\text{M}$. Ce résultat est en accord avec la valeur de K_d obtenue par spectroscopie UV-visible ($36 \pm 5 \mu\text{M}$). Par conséquent, lorsque le filtre interne provoqué par le FMN_{ox} est corrigé, l'étude du quenching de fluorescence de ActVA par ce dernier est une approche tout à fait adaptée à l'étude de l'équilibre de fixation de la flavine sur ActVA.

II.1.B.b Fixation du FMN_{red} sur ActVA

Le même type d'expérience a été réalisé en présence de FMN_{red}. Pour éviter son oxydation par l'oxygène, ces expériences ont été effectuées en anaérobiose. L'ajout de quantités croissantes de FMN_{red} à une solution de ActVA, entraîne un quenching de fluorescence similaire à celui observé en présence de FMN_{ox}. Les spectres sont corrigés du filtre interne provoqué par l'absorbance du FMN_{red} dans les zones d'absorption et d'émission des tryptophanes. Les quantités de ActVA complexée, présentes à l'équilibre, sont déterminées d'après la valeur d'intensité de fluorescence corrigée mesurée à 339 nm (cf matériels et méthodes). La figure 15 illustre la variation de ces quantités en fonction du FMN_{red} libre. L'ajustement de ces données par une fonction hyperbole (équation 16) nous permet de démontrer à nouveau que cette variation de fluorescence témoigne d'un équilibre de fixation entre le FMN_{red} et ActVA. D'après les paramètres de cet ajustement un K_d de $0,39 \pm 0,04 \mu\text{M}$ est déterminé.

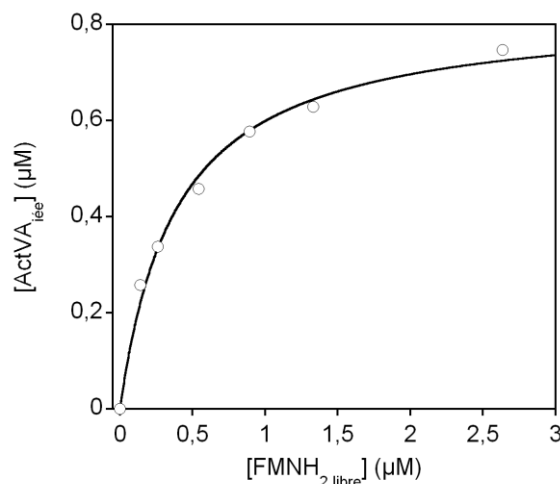


Figure 15. Détermination de la constante de dissociation du FMN_{red} pour ActVA par spectrofluorimétrie. Les concentrations de ActVA liée, calculées à partir des variations du spectre de fluorescence de ActVA (concentration totale 1 μM) à 339 nm, mesurées à 18°C en anaérobiose, sont représentées en fonction de la concentration de FMN_{red} libre. L'ajustement de ces données est réalisé avec une hyperbole de saturation. Le K_d obtenu est de $0,39 \pm 0,04$ μM.

Le tableau I résume les différentes valeurs de K_d mesurées pour les équilibres de fixation du FMN_{ox} et du FMN_{red} sur ActVA et ActVB.

	ActVA	ActVB
FMN _{ox}	24 ± 3^a μM 36 ± 5^b μM	$4,4 \pm 0,6^b$ μM
FMN _{red}	$0,39 \pm 0,04^a$ μM	$6,6 \pm 0,6^{b, c}$ μM

Tableau I. Constantes de dissociation des équilibres de fixation du FMN_{ox} et FMN_{red} sur ActVA et ActVB, déterminées dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6 à 18°C. (a) valeurs obtenues par titration fluorimétrique, (b) valeurs obtenues par titration spectroscopique, (c) valeurs obtenues en présence d'un excès de NAD⁺.

Ces données montrent que l'affinité de la flavine pour les deux protéines est influencée par son état redox. A l'état réduit, la flavine est plus affine pour ActVA alors que dans son état oxydé, elle possède une meilleure affinité pour ActVB. D'un point de vue thermodynamique, le transfert de flavine est donc favorable de ActVA vers ActVB dans son état oxydé et de ActVB vers ActVA dans son état réduit. Ce transfert ne semble donc pas nécessiter de complexe interprotéique. C'est la première fois qu'une étude quantitative complète est rapportée pour ce genre de systèmes à deux composants.

D'après ces résultats, nous pouvons proposer un mécanisme catalytique illustré par le schéma 2.

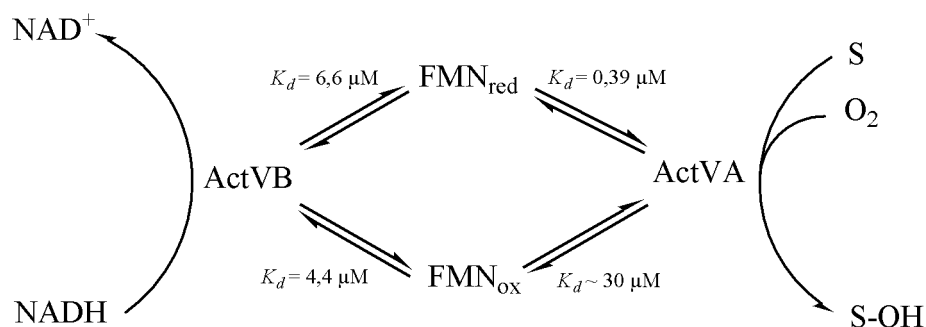


Schéma 2. Mécanisme catalytique proposé pour le système ActVA-ActVB. Les valeurs de K_d du tableau I sont reportées sur ce schéma.

ActVB fixe le FMN_{ox} puis catalyse sa réduction en FMN_{red} . Comme ce dernier possède une meilleure affinité pour ActVA, il est spontanément transféré à la monooxygénase. Il est ensuite oxydé par l'oxygène moléculaire et permet le transfert d'un groupement OH au substrat à hydroxyler (S). Le FMN_{ox} ainsi régénéré possède une meilleure affinité pour la réductase que pour la monooxygénase. Il est donc restitué à la réductase qui peut ainsi amorcer un nouveau cycle catalytique.

Pour le système HpaB-HpaC, il a été rapporté que la monooxygénase HpaB a une très bonne affinité pour le FADH_2 ($K_d = 70 \text{ nM}$) (Louie et coll, 2003). De plus, la concentration intracellulaire de HpaB (chez *E. coli* W) est 9 fois plus grande que celle de la flavine. Ces deux propriétés suggèrent que, *in vivo*, la flavine réduite par la réductase HpaC est spontanément transférée à HpaB sans nécessiter de complexe interprotéique. Cependant, notons que dans ces travaux, les K_d du FMN_{ox} et FMN_{red} pour la réductase n'ont pas été déterminés.

II.2 Interactions du FMN_{ox} et FMN_{red} avec le mélange ActVA-ActVB

La détermination des valeurs de K_d du FMN_{ox} et FMN_{red} a été réalisée avec les enzymes ActVA et ActVB isolées l'une de l'autre. Afin de vérifier que la présence simultanée des deux enzymes ne modifie pas leurs propriétés intrinsèques vis-à-vis du FMN, l'interaction de cette flavine avec le mélange ActVA-ActVB a été étudiée.

II.2.A Transfert de FMN_{ox} de ActVA vers ActVB

Nous avons vu dans la section précédente que la valeur de λ_{max} du spectre UV-visible du FMN_{ox} permet d'identifier à quelle protéine du système il est fixé (figure 4). Lorsque le

FMN_{ox} est totalement complexé à ActVA, le λ_{max} est de 437 nm. Par contre, lorsqu'il est totalement complexé à ActVB, le λ_{max} est de 457 nm. Cette propriété tout à fait particulière a donc été employée pour suivre le transfert de FMN_{ox} de ActVA vers ActVB.

Une solution de FMN_{ox} (10 μM) complexé à ActVA (140 μM) est incubée en aérobiose dans une cuve spectrophotométrique à 25°C. Des quantités croissantes de ActVB sont ajoutées graduellement à cette solution et le spectre UV-visible du mélange final est enregistré. La figure 17 montre l'évolution du λ_{max} obtenu après le mélange en fonction du ratio [ActVB] / [ActVA].

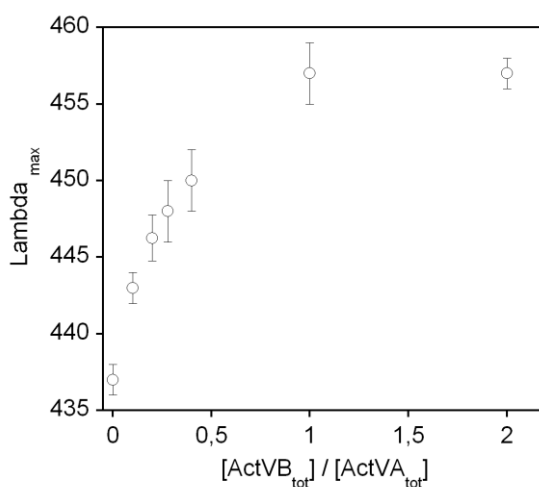


Figure 17. Transfert du FMN_{ox} de ActVA vers ActVB. Un mélange contenant 10 μM de FMN_{ox} et 140 μM de ActVA en solution dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, est incubé en présence de différentes quantités de ActVB. Le spectre UV-visible du mélange final est mesuré à 25°C et son λ_{max} est reporté en fonction du rapport [ActVB_{tot}] / [ActVA_{tot}].

En accord avec les résultats précédents, le λ_{max} du spectre UV-visible du mélange initial est centré sur 437 nm. En absence de ActVB, le FMN_{ox} est complexé à ActVA. Lorsque des quantités croissantes de ActVB sont ajoutées au mélange réactionnel, le λ_{max} augmente et atteint 457 nm après l'ajout d'environ 1 équivalent de ActVB par rapport à ActVA. Cette valeur de λ_{max} finale est caractéristique du complexe ActVB:FMN_{ox}. Il semble donc que dans nos conditions expérimentales, le FMN_{ox}, initialement complexé par ActVA, a été totalement transféré à ActVB. Le sens de ce transfert est tout à fait en accord avec les valeurs de K_d déterminées plus haut (tableau I).

II.2.B Transfert du FMN_{red} de ActVB vers ActVA

Comme nous l'avons vu, l'interaction du FMN_{red} avec le NAD⁺ au sein du site actif de ActVB est caractérisée par une large bande de transfert de charge située entre 500 et 800 nm (Filisetti

et coll, 2003). Cette signature spectroscopique a été utilisée pour étudier cette fois-ci le transfert de FMN_{red} de ActVB vers ActVA.

Une solution de FMN (25 μ M), totalement complexé à ActVB (60 μ M), est incubée en anaérobiose dans une cuve spectrophotométrique à 18°C. 25 μ M de NADH sont ensuite ajoutés, provoquant la réduction totale du FMN et l'apparition de la bande de transfert de charge (figure 18). Lorsque environ 1 équivalent de ActVA (par rapport à ActVB) est ajouté à ce mélange, 90 % de cette bande de transfert de charge disparaît (figure 18). Ceci indique que la présence de ActVA entraîne la dissociation du complexe de transfert de charge NAD⁺:FMN_{red} ce que suggère donc fortement que le FMN_{red} a été transféré de ActVB à ActVA.

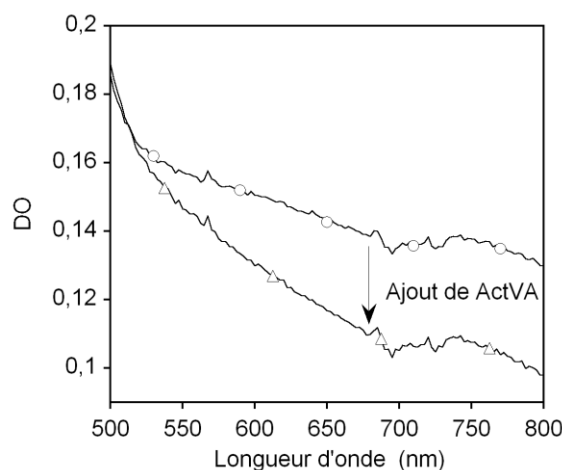


Figure 18. Transfert de FMN_{red} entre ActVB et ActVA. ActVA (50 μ M) est ajoutée en anaérobiose et à 18°C à un mélange réactionnel contenant 25 μ M de FMN_{red}, 25 μ M de NAD⁺ et 60 μ M de ActVB. Les spectres UV-visibles du mélange sont réalisés avant (○) et après (△) l'ajout de ActVA.

De nouveau, ce résultat est tout à fait en accord avec les valeurs de K_d obtenues indépendamment pour les équilibres de fixation du FMN_{red} sur ActVA et sur ActVB. La présence simultanée des deux protéines ne semble pas influencer leurs propriétés de fixation de la flavine. Il semble donc que le transfert de flavine soit uniquement contrôlé par les paramètres thermodynamiques de fixation de la flavine et qu'il ne nécessite pas la formation d'un complexe spécifique entre ActVA et ActVB.

II.3 Interaction entre ActVA et ActVB ?

Nous avons voulu vérifier si un éventuel complexe ActVA-ActVB pouvait cependant se former. La présence d'une étiquette poly-histidine dans la partie C-terminale de la séquence de ActVB, a été utilisée dans ce but. Un mélange équimolaire de ActVB His-tag et ActVA est

chargé sur une colonne d'affinité Ni-NTA. La matrice est tout d'abord lavée à trois reprises par 3 volumes de colonne d'un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contenant 50 mM d'imidazole afin d'éviter toute fixation aspécifique de ActVA sur la résine Ni-NTA. 3 volumes de colonne du même tampon contenant 500 mM d'imidazole sont ensuite ajoutés afin d'éluer les protéines accrochées à la matrice. Des fractions de 1 mL sont récupérées tout au long de l'expérience, puis analysées par SDS-PAGE. La figure 19 montre la partie la plus informative du gel obtenu. La piste n°1 montre les protéines qui n'ont pas été retenues sur la colonne tandis que la piste n°2 présente les protéines qui se sont fixées de façon spécifique sur la colonne. La bande de 39 kDa, présente sur la piste n°1 et absente de la piste n°2, montre clairement que ActVA n'est pas retenue sur la colonne en présence de ActVB. En effet, sur la piste n°2, seule la bande correspondant à ActVB (18 kDa) apparaît. Par conséquent, dans ces conditions, ActVA n'interagit pas avec ActVB.

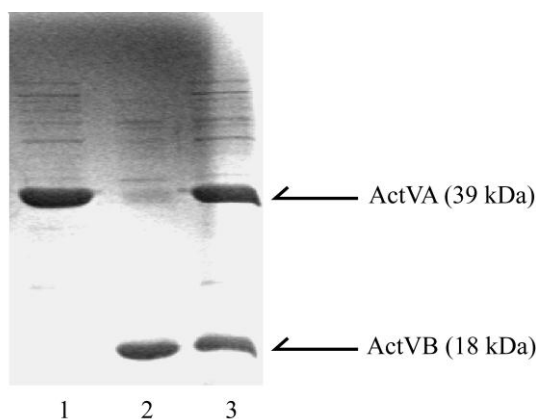


Figure 19. Interaction entre ActVA et ActVB. Gel SDS-PAGE 15 % des fractions récupérées en sortie de colonne Ni-NTA. 1 : fraction récupérée après le premier lavage en présence de 50 mM d'imidazole ; 2 : fraction récupérée après l'élution en présence de 500 mM imidazole ; 3 : mélange équimolaire de ActVA et ActVB chargé sur la colonne (contrôle).

Ces résultats suggèrent que dans nos conditions expérimentales, il n'existe pas de forte interaction entre ActVA et ActVB. Ces deux protéines ne sont donc pas susceptibles de former un complexe pour transférer la flavine.

II.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié le mécanisme de transfert de flavine entre ActVA et ActVB. Partant d'une hypothèse de transfert par diffusion passive, il nous a semblé intéressant de comparer l'affinité de la flavine pour les deux protéines. A l'aide d'une combinaison de différentes techniques spectroscopiques, les constantes d'équilibre de dissociation de la flavine oxydée et réduite vis-à-vis de ActVA et ActVB ont été déterminées.

Les valeurs obtenues montrent clairement qu'à l'état réduit, la flavine est plus affine pour ActVA que pour ActVB, alors qu'à l'état oxydé, cette tendance est inversée et la flavine possède une meilleure affinité pour ActVB que pour ActVA. En accord avec ces résultats, nous avons pu montrer que la flavine est transférée spontanément de ActVA à ActVB à l'état oxydé et de ActVB vers ActVA à l'état réduit sans nécessiter à priori, d'interaction entre les deux protéines.

L'ensemble de ces résultats permet de montrer que le transfert de flavine entre la réductase et la monooxygénase du système ActVA-ActVB est effectué par diffusion passive et que le sens de ce transfert est dicté par l'affinité de la flavine pour les deux protéines.

III Activation de l'oxygène catalysée par le système ActVA-ActVB

III.1 Identification d'un intermédiaire hydroperoxyflavine

Comme nous l'avons vu en introduction, le système ActVA-ActVB est capable de réaliser l'hydroxylation de la DHAQ en présence de NADH, de FMN et d'oxygène. Comme cela a été décrit en introduction, l'addition d'un atome d'oxygène sur une molécule organique comme la DHAQ à partir d'oxygène moléculaire, n'est pas spontanée. L'oxygène moléculaire, inerte dans son état fondamental, doit donc être activé par un catalyseur pour pouvoir réagir. Dans le cas des flavoprotéines hydroxylases (schéma 1A), l'oxygène est activé par réduction à deux électrons sous forme d'hydroperoxyflavine (Palfey et coll, 1995). Cet intermédiaire très instable, est capable de transférer efficacement un groupement hydroxyle à un substrat. Bien qu'il ait une durée de vie très courte, son spectre UV-visible a pu être caractérisé en détail par cinétique rapide pour différentes flavoenzymes (Entsch et coll, 1976; Hastings et coll, 1975). Il possède une bande d'absorption majoritaire centrée à ~ 380 nm (cf introduction, figure 11, p 13).

Afin de déterminer si le système ActVA-ActVB catalyse l'activation de l'oxygène moléculaire via la formation de cet intermédiaire hydroperoxyflavine, les expériences suivantes ont été réalisées.

III.1.A Oxydation du FMN_{red} en présence de ActVA

Une solution de FMN_{red} (24 μ M) est mise en présence de ActVA (50 μ M) en anaérobiose. Dans ces conditions et d'après la valeur de K_d que nous avons déterminée (tableau I), plus de 98 % du FMN_{red} est complexé à ActVA. La réaction d'oxydation du complexe est initiée par l'ajout d'oxygène moléculaire à partir d'une solution stock saturée en oxygène pur ($[O_2] \sim 1$ mM en solution). La figure 20 illustre l'évolution du spectre UV-visible du mélange au cours du temps.

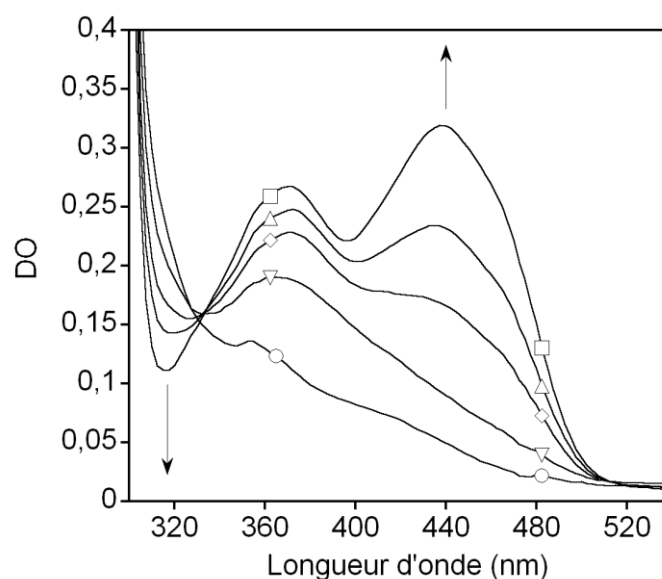


Figure 20. Réaction du complexe ActVA:FMN_{red} avec l'oxygène moléculaire : identification d'un intermédiaire hydroperoxyflavine. 24 μM de FMN_{red} sont incubés en présence de 50 μM de ActVA dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6 en anaérobiose et à 18°C. La réaction est initiée par l'ajout d'oxygène moléculaire (62 μM final) puis suivie par spectroscopie UV-visible. Les spectres sont enregistrés 0 (○), 15 (▽), 61 (◇), 126 (△) et 514 s (□) après l'ajout d'O₂. Les flèches indiquent le sens de l'évolution des spectres au cours de la réaction.

L'addition d'oxygène entraîne l'oxydation complète de la flavine après environ 5 minutes de réaction. Le spectre final présente deux bandes d'absorption centrées sur 370 et 438 nm, caractéristiques du FMN_{ox} complexé à ActVA (figure 5, □, p 61). Ceci indique que le FMN demeure au sein du site actif de ActVA durant tout le processus d'oxydation. Le spectre obtenu 15 s après l'ajout d'oxygène (▽), est différent du spectre de FMN_{ox} (□). Il possède une bande d'absorption majoritaire centrée sur 370 nm, caractéristique d'une molécule d'hydroperoxyflavine (Entsch et coll, 1989; Entsch et coll, 1976). Ces données suggèrent que cette espèce se forme très rapidement à partir de ActVA:FMN_{red} et d'O₂ (phase rapide) puis se transforme beaucoup plus lentement en FMN_{ox} (phase lente). Il semble donc que le site actif de ActVA soit capable de stabiliser un intermédiaire hydroperoxyflavine.

Les données cinétiques présentées ci-dessous confirment cette idée. La figure 21 illustre l'évolution de l'absorbance du mélange à 370 et 437 nm au cours du temps après l'ajout d'oxygène.

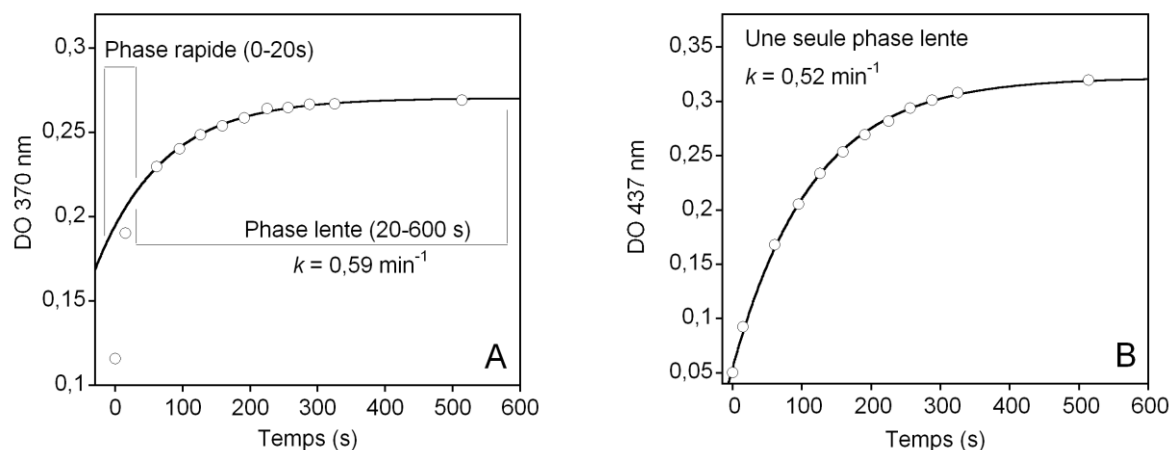


Figure 21. Cinétique d'oxydation du complexe ActVA:FMN_{red} par l'oxygène moléculaire. 24 μM de FMN_{red} sont incubés en présence de 50 μM de ActVA dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6 en anaérobiose et à 18°C. La réaction est initiée par l'ajout d'oxygène moléculaire (62 μM final) puis suivie par spectroscopie UV-visible à 437 (A) et 370 nm (B). L'ajustement de ces données est effectué avec une fonction exponentielle. En A, seules les données obtenues après 20 s sont prises en compte pour cet ajustement. Les constantes de vitesse obtenues sont $k_{370 \text{ nm}} = 0,59 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ et $k_{437 \text{ nm}} = 0,52 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$.

Les données obtenues à 370 nm (figure 21A) montrent que l'oxydation du complexe ActVA:FMN_{red} s'effectue en deux phases distinctes : une première phase rapide de 0 à 20 s (temps mort du mélange) suivie d'une seconde phase plus lente de 20 à 600 s. A 437 nm, où la contribution de l'intermédiaire hydroperoxyflavine est négligeable (cf introduction, figure 11, p 13), seule une phase lente est observée de 0 à 600 s (figure 21B).

Lorsque le phénomène rapide (0 - 20 s) observé à 370 nm n'est pas pris en compte, les cinétiques obtenues aux deux longueurs d'onde (370 et 437 nm) peuvent être ajustées par la fonction exponentielle décrite par l'équation 17.

$$v = a + (1 - b \exp^{-kt}) \quad \text{Equation 17}$$

a est la valeur de DO mesurée avant l'ajout d'oxygène et b est la différence de DO entre le début et la fin de réaction.

Les constantes de vitesse mesurées à 370 nm (entre 20 et 600 s) et à 437 nm (entre 0 et 600 s) sont pratiquement identiques ($k_{370 \text{ nm}} = 0,59 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ et $k_{437 \text{ nm}} = 0,52 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$). De plus, la figure 22 montre qu'elles sont indépendantes de la concentration d'oxygène.

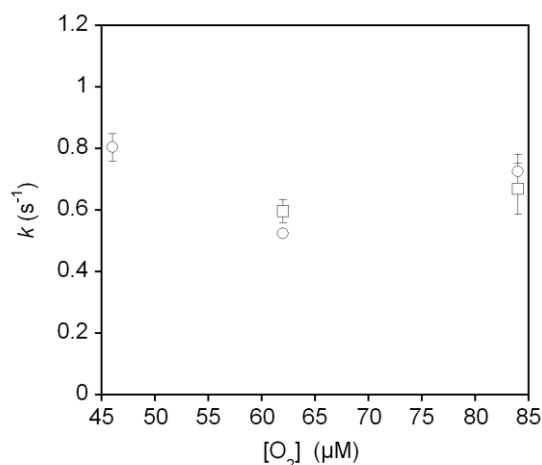


Figure 22. Effet de la concentration d'oxygène sur les constantes de vitesse d'oxydation $k_{437 \text{ nm}}$ (○) et $k_{370 \text{ nm}}$ (□).

Enfin, le processus lent ne fait pas intervenir d'espèce intermédiaire qui absorbe dans le visible, comme en atteste la présence du point isobestique situé à 333 nm (figure 20).

Il semble donc que la phase lente observée aux deux longueurs d'onde, corresponde à une réaction de premier ordre qui n'implique pas l'oxygène. De plus, la présence d'une phase initiale très rapide à 370 nm indique que le processus global d'oxydation du complexe ActVA:FMN_{red}, s'effectue via la formation d'une espèce intermédiaire qui n'absorbe pas à 437 nm. Enfin, l'oxydation du complexe ActVA:FMN_{red} observée dans cette expérience est beaucoup plus lente que celle du FMN_{red} libre. En effet, dans des conditions identiques à celles de la figure 21 et en absence de ActVA, le FMN_{red} s'oxyde presque instantanément.

L'ensemble de ces données suggère fortement que le FMN_{red} complexé à ActVA réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire (0 - 20 s) pour former un intermédiaire hydroperoxyflavine (schéma 3, étape 1). Stabilisé dans un premier temps par le site actif de ActVA, celui-ci se transforme ensuite lentement en FMN_{ox} selon un phénomène de premier ordre indépendant de la concentration d'oxygène (schéma 3, étape 2).

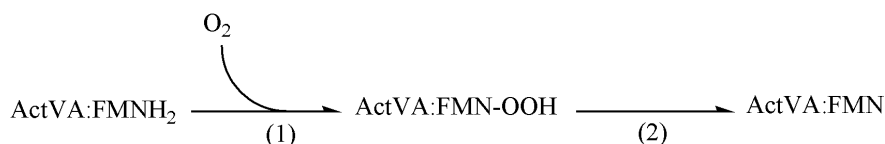


Schéma 3. Processus d'oxydation du complexe ActVA:FMN_{red} par l'oxygène moléculaire.

ActVA contrôle donc l'oxydation du FMN_{red} en favorisant la formation d'un intermédiaire hydroperoxyflavine. De façon tout à fait surprenante, en absence de substrat à hydroxyler, cet hydroperoxyflavine est fortement stabilisé au sein du site actif de ActVA puisqu'il est

déTECTABLE à l'échelle de la dizaine de secondes à température ambiante. Ce résultat est très différent de ce qui a été rapporté dans le cas des flavoprotéines hydroxylases, où cet intermédiaire n'est observable uniquement par stopped-flow, à l'échelle de la milliseconde et à basse température (Entsch et coll, 1989; Entsch et coll, 1976). Dans le cas du système ActVA-ActVB, celui-ci est vraisemblablement l'espèce oxydante permettant le transfert d'un groupement hydroxyle à la molécule de DHAQ. Enfin, comme il se forme au sein de ActVA en absence de ActVB, il semble que ActVA soit effectivement la monooxygénase de ce système.

III.1.B Oxydation du FMN_{red} en présence de ActVA et de ActVB

La réduction du FMN_{ox} nécessaire à réaliser les expériences précédentes a été effectuée par voie photochimique à l'aide de déazaflavine et d'EDTA (cf matériels et méthodes). Qu'en est-il lorsque cette étape est réalisée par ActVB ?

Une solution de complexe ActVB:FMN_{ox} (concentrations finales respectives de 50 et 16,8 µM) est incubée en anaérobiose ($O_2 < 5$ ppm) en présence d'un faible excès de NADH par rapport au FMN_{ox}. ActVA (solution désoxygénée, 50 µM final) est ajouté au complexe ActVB:FMN_{red}:NAD⁺ ainsi formé et l'oxydation de cette solution est ensuite initiée par l'ajout d'oxygène moléculaire (50 µM final). La réaction est suivie par spectroscopie UV-visible (figure 23).

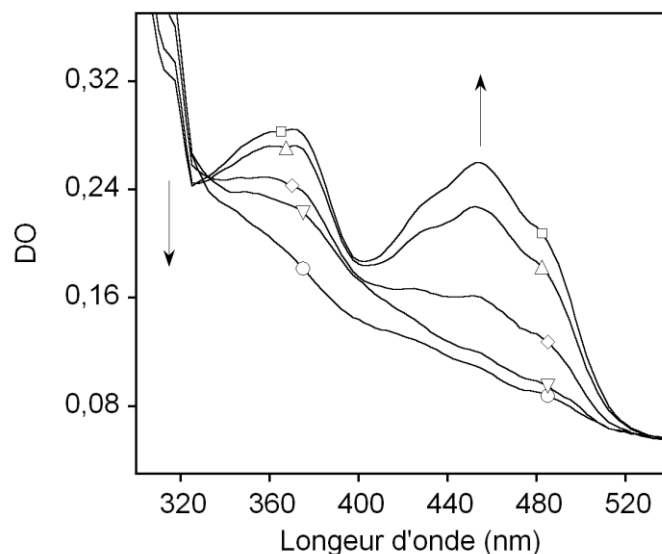


Figure 23. Réaction du FMN_{red} avec l'oxygène moléculaire en présence de ActVA et ActVB : identification d'un intermédiaire hydroperoxyflavine. 16 μM de FMN_{ox} sont incubés en présence de 50 μM de ActVB puis réduits par environ 1 équivalent de NADH par rapport au FMN_{ox} , dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6 en anaérobiose et à 18°C. ActVA est ensuite ajoutée (50 μM final) puis la réaction est initiée par l'ajout d'oxygène moléculaire (50 μM final) et suivie par spectroscopie UV-visible. Les spectres sont enregistrés 0 (○), 15 (▽), 82 (◇), 284 (△) et 600 s (□) après l'ajout d' O_2 .

L'évolution des spectres UV-visibles au cours de ce processus d'oxydation est tout à fait comparable à celle que nous avons observée en absence de ActVB (figure 20). La seule différence est que la valeur de λ_{max} du spectre final de 457 nm indique que le FMN se trouve au sein du site actif de ActVB en fin de réaction (figure 5, △, p 63). Lorsque cette expérience est réalisée en absence de ActVA, l'oxydation du complexe ActVB: FMN_{red} est très rapide et aucune forme intermédiaire n'est détectée. ActVB n'a pas la capacité de contrôler l'oxydation du FMN_{red} . Cette caractéristique est donc spécifique de ActVA.

Il apparaît donc clairement que la vitesse d'oxydation du FMN_{red} dépend de l'enzyme (ActVA ou ActVB) à laquelle il est fixé. La figure 24 illustre la variation de cette vitesse lorsque l'oxydation du complexe ActVB: FMN_{red} est réalisée en présence de quantités croissantes de ActVA (0 - 100 μM).

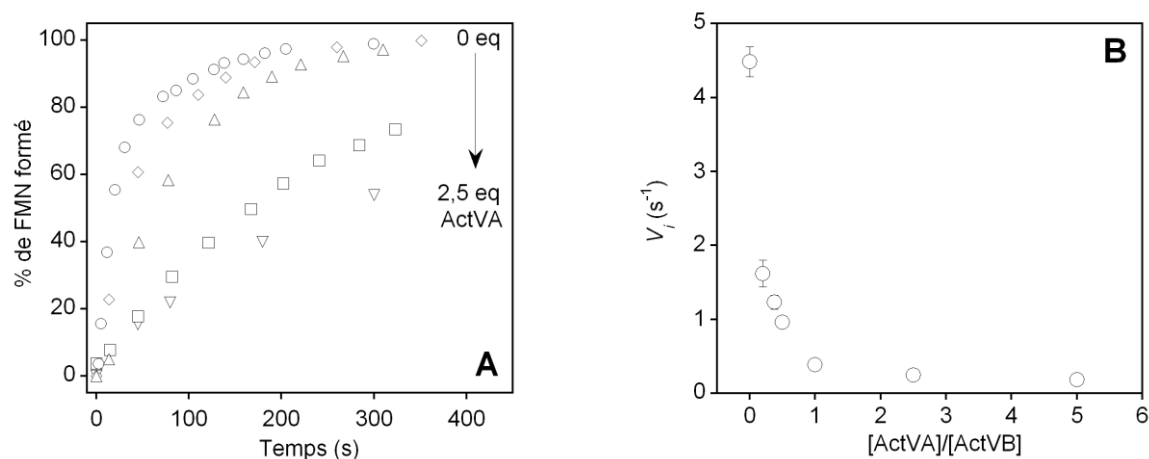


Figure 24. Evolution de la vitesse d'oxydation du complexe $\text{FMN}_{\text{red}}:\text{ActVB}$ en fonction de la concentration de ActVA. 40 μM de ActVB contenant 16 μM de FMN_{ox} sont incubés en présence d'1 équivalent de NADH dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6, en anaérobiose et à 18°C. Des quantités croissantes de ActVA sont ajoutées au complexe $\text{NAD}^+:\text{FMN}_{\text{red}}:\text{ActVB}$. La réaction d'oxydation est ensuite initiée par l'ajout d'oxygène (50 μM final) et suivie par spectroscopie UV-visible à 457 nm. (A) : évolution de la $\text{DO}_{457 \text{ nm}}$ du mélange réactionnel contenant 0 (\circ), 0,2 (\diamond), 0,5 (Δ), 1,0 (\square) et 2,5 (∇) équivalents de ActVA par rapport à ActVB, après ajout de l'oxygène. (B) : dépendance de la vitesse initiale d'oxydation du FMN_{red} en fonction du rapport $[\text{ActVA}] / [\text{ActVB}]$.

La vitesse initiale d'oxydation de la flavine diminue lorsque la quantité de ActVA augmente. En présence d'un excès de ActVA (quantité de ActVA > 1 équivalent par rapport à ActVB), cette vitesse est identique à la vitesse d'oxydation du complexe ActVA: FMN_{red} seul. A la différence de ActVB, ActVA contrôle l'oxydation de la flavine. Ce résultat indique que le FMN_{red} , initialement situé au sein du site actif de ActVB, est transféré à ActVA avant d'être oxydé par l'oxygène moléculaire. Le sens de ce transfert est tout à fait en accord avec les valeurs de K_d obtenues précédemment (tableau I).

L'ensemble de ces résultats peut être résumé par le schéma 4 suivant.

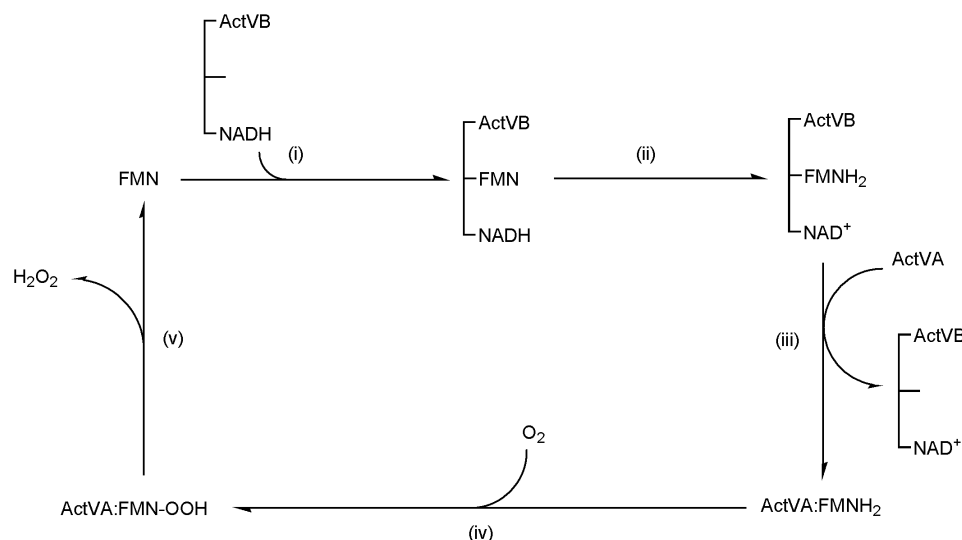


Schéma 4. Cycle de réduction-oxydation du FMN en présence du système ActVA-ActVB et en absence de substrat à hydroxyler.

D'après ce schéma, le FMN_{ox} se fixe à ActVB (i) où il est réduit par le NADH (ii). Le FMN_{red} ainsi formé est ensuite transféré à ActVA (iii) où il est oxydé en hydroperoxyflavine (iv). En absence de substrat à hydroxyler, cette espèce intermédiaire se décompose lentement en FMN_{ox} , et vraisemblablement en H_2O_2 . Le FMN_{ox} ainsi régénéré, est ensuite transféré à ActVB (v) où il peut amorcer un nouveau cycle catalytique.

En conclusion, les expériences de la figure 24 illustrent trois propriétés importantes du système ActVA-ActVB vis-à-vis de la flavine réduite et de l'oxygène moléculaire.

- A l'état réduit, le FMN est instantanément transféré de ActVB vers ActVA.
- Au sein de ActVA, l'oxydation du FMN_{red} est totalement contrôlée. Elle s'effectue par l'intermédiaire d'une forme hydroperoxyflavine.
- En absence de substrat à hydroxyler, l'hydroperoxyflavine est remarquablement stabilisée au sein du site actif de ActVA et se décompose lentement en FMN_{ox} et H_2O_2 .

III.2 Caractérisation de l'intermédiaire hydroperoxyflavine à l'état stationnaire

III.2.A Identification de l'intermédiaire à l'état stationnaire

Dans l'expérience précédente, la formation de l'intermédiaire hydroperoxyflavine a été observée au cours d'un seul cycle catalytique car la quantité de NADH était limitante. Afin d'étudier le comportement du système ActVA-ActVB dans des conditions de cycles

catalytiques multiples, les expériences suivantes ont été réalisées en présence d'excès de NADH et d'oxygène par rapport au FMN_{ox}.

Une solution contenant 46 μM de FMN_{ox}, 104 μM de ActVA et 200 μM de NADH est placée en aérobiose ($\sim 200 \mu\text{M}$ d'O₂) dans une cuve spectrophotométrique. ActVB (155 nM final) est ensuite ajoutée et la réaction est suivie par spectroscopie UV-visible. Dans ces conditions, les concentrations de FMN_{ox} et de NADH sont très supérieures aux K_m de ActVB pour ces deux espèces ($K_m \text{ FMN}_{\text{ox}} = 1 \mu\text{M}$ et $K_m \text{ NADH} = 6,6 \mu\text{M}$). ActVB catalyse donc la réduction du FMN_{ox} à sa vitesse maximale. D'autre part, ActVA est ajoutée en excès par rapport à ActVB et au FMN_{ox}. Dans ces conditions, et en accord avec les valeurs de K_d déterminées dans le chapitre précédent, la flavine réduite libérée par ActVB doit être totalement complexée par la monooxygénase. Le résultat de cette expérience est illustré dans la figure 25.

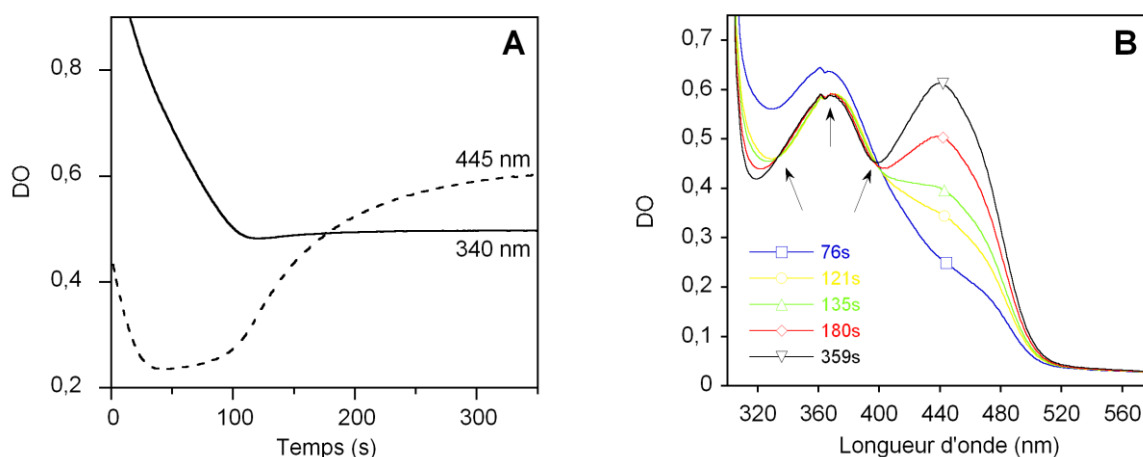


Figure 25. Accumulation de l'intermédiaire FMNOOH à l'état stationnaire. 46 μM de FMN_{ox} sont incubés à 25°C, en aérobiose ([O₂] $\sim 200 \mu\text{M}$) en présence de 104 μM de ActVA et 200 μM de NADH dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6. 155 nM de ActVB sont ensuite ajoutés et la réaction est suivie par spectroscopie UV-visible. (A) : évolution de l'absorbance à 340 nm (trait continu) et à 445 nm (trait en pointillés). (B) : spectres UV-visibles du mélange, enregistrés 76 (\square), 121 (\circ), 135 (Δ), 180 (\diamond) et 359 s (∇) après l'ajout de ActVB. Les flèches indiquent les points isobestiques situés à 333, 365 et 399 nm.

L'ajout de ActVB entraîne une oxydation de la totalité du NADH durant la première phase de la réaction comme en attestent la diminution de l'absorbance à 340 nm de 0 à 100 s, et le plateau observé de 100 à 350 s (figure 25A). Le FMN_{ox} est lui aussi transformé (décroissance de l'absorbance à 445 nm) en une espèce dont la concentration reste constante (plateau à 445 nm) jusqu'à ce que la totalité du NADH soit oxydée (~ 100 s). Le spectre de cette espèce possède la bande à 370 nm caractéristique d'une hydroperoxyflavine (figure 25B, \square) (Palfey et coll, 1995). La faible bande d'absorption observée à 445 nm sur ce même spectre correspond vraisemblablement à du FMN_{ox} résiduel présent à l'état stationnaire. Après 100 s, lorsque tout le NADH est oxydé, l'hydroperoxyflavine se réoxyde lentement et totalement en

FMN_{ox} comme en atteste l'augmentation de l'absorbance à 445 nm. L'ensemble de ce processus (100 - 359 s) ne fait intervenir qu'une espèce intermédiaire comme le montre la présence des points isobestiques situés à 333, 365 et 399 nm (figure 25B). Notons que le spectre enregistré à 76 s, ne partage pas ces trois points (figure 25B, □). En effet, il contient, en plus du signal de l'hydroperoxyflavine, une absorbance supplémentaire à 340 nm due à la présence de NADH résiduel.

Cette expérience montre clairement qu'en absence de substrat à hydroxyler et en présence d'oxygène et d'un excès de NADH, le système ActVA-ActVB parvient à accumuler une espèce intermédiaire hydroperoxyflavine à l'état stationnaire. La concentration de cette espèce est maintenue constante jusqu'à ce que tout le pouvoir réducteur du NADH soit épuisé. Ceci indique que la décomposition de l'hydroperoxyflavine est l'étape limitante du cycle de réduction-oxydation du FMN en présence du système ActVA-ActVB (schéma 5).

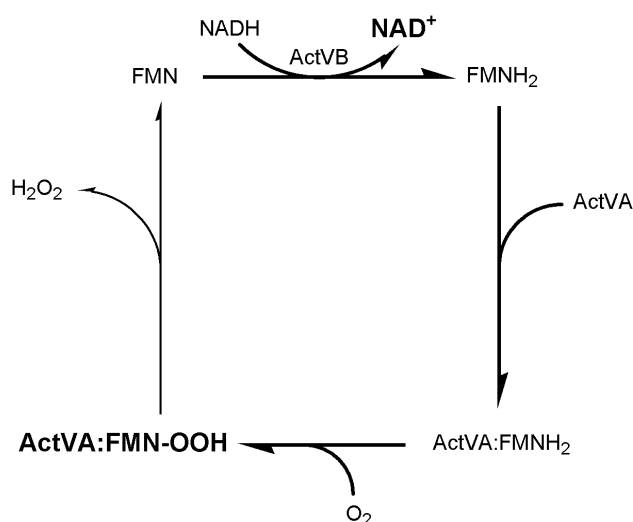


Schéma 5. Fonctionnement du système ActVA-ActVB à l'état stationnaire en absence de substrat à hydroxyler. Les étapes rapides et les espèces qui s'accumulent sont représentées en gras.

Des cinétiques similaires à celles de la figure 25A ont été rapportées dans le cas du système HpaB-HpaC (Xun et coll, 2000). Cependant, les auteurs ont interprété la diminution d'absorbance observée à 445 nm durant la première phase de leur expérience comme une accumulation de flavine réduite au sein de la monooxygénase HpaB. Contrairement à ce que nous avons fait, ces auteurs n'ont pas pris en compte l'évolution globale du spectre UV-visible qui nous a permis d'identifier un intermédiaire hydroperoxyflavine avec le système ActVA-ActVB.

C'est donc la première fois qu'une telle espèce est identifiée à l'état stationnaire pour ce type de système à deux composants.

III.2.B Stoechiométrie hydroperoxyflavine/ActVA

Afin de déterminer la stoechiométrie de formation de l'espèce hydroperoxyflavine par rapport à ActVA, le même type d'expérience a été réalisé en présence de quantités croissantes de ActVA. Comme le montre la figure 26, la valeur d'absorbance à 445 nm, obtenue à l'état stationnaire (entre 50 et 100 s de réaction), diminue en fonction de la quantité de ActVA ajoutée au mélange.

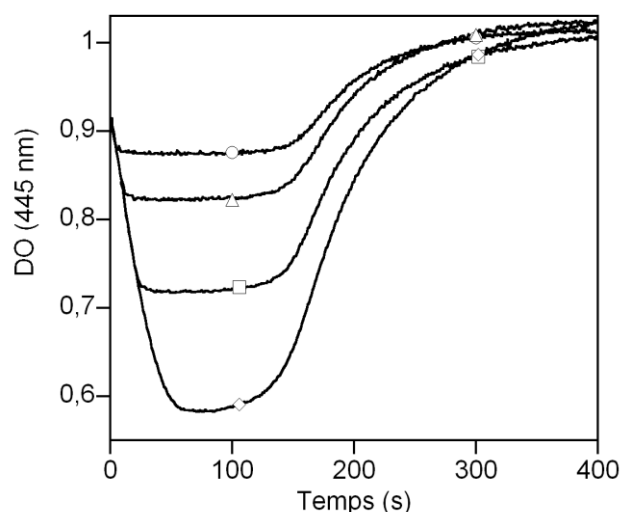


Figure 26. Effet de la concentration de ActVA sur l'accumulation du FMNOOH formé à l'état stationnaire. Un mélange contenant 80 μM de FMN_{ox} et 200 μM de NADH dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé à 25°C en aérobiose ($[\text{O}_2] \sim 200 \mu\text{M}$) en présence de quantités croissantes de ActVA. ActVB (150 nM final) est ensuite ajoutée et la réaction est suivie par spectroscopie UV-visible à 445 nm. Les signaux sont enregistrés au cours du temps, lorsque le mélange contient 26 (○), 36 (Δ), 52 (□) et 78 μM (◇) de ActVA.

Ceci indique que la quantité d'hydroperoxyflavine accumulée à l'état stationnaire augmente proportionnellement à ActVA. La concentration de FMN_{ox} converti en FMNOOH peut être déterminée à partir de la différence entre la DO à 445 nm initiale et celle obtenue à l'état stationnaire. La figure 27 montre l'évolution de cette concentration en fonction de la quantité de ActVA. La droite obtenue indique que la quantité de FMNOOH, stabilisé à l'état stationnaire, est directement proportionnelle à la concentration de ActVA. Il semble donc que le complexe ActVA:FMNOOH se forme de manière stoechiométrique. La valeur de la pente de cette droite (pente = 0,5), indique qu'une molécule de FMNOOH est formée par dimère de ActVA.

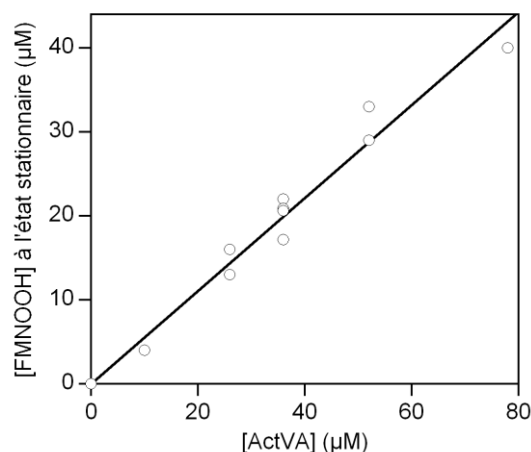


Figure 27. Dépendance de la concentration de FMNOOH formé à l'état stationnaire en fonction de la concentration de ActVA. La droite est obtenue par régression linéaire des données expérimentales. La valeur de la pente est de 0,55.

Ce résultat suggère que le dimère de ActVA possède un seul site de fixation pour le FMNOOH. Ce site pourrait se situer à l'interface séparant les deux monomères. Il est également possible que ce dimère contienne deux sites de fixation équivalents pour la flavine, sans qu'il ne lui soit possible de former simultanément deux molécules de FMNOOH. Il sera intéressant de déterminer si la stoechiométrie de fixation du FMN_{ox} et FMN_{red} sur ActVA, est la même que celle du FMNOOH. Cela permettrait de trancher entre ces deux hypothèses.

III.3 Conclusion

Le mécanisme d'activation de l'oxygène par le système ActVA-ActVB a été étudié. Cette activation se réalise au sein du site actif de ActVA, la monooxygénase du système. En absence de ActVB, la flavine réduite complexée à ActVA réagit très rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former un intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine (FMNOOH). Cette espèce est remarquablement stabilisée au sein du site actif de ActVA et se décompose lentement en FMN_{ox} et H₂O₂. Cet intermédiaire est également observé à l'état stationnaire en présence de ActVB. Dans ces conditions, la flavine réduite, générée de façon constante par l'activité flavine réductase, est transférée très rapidement à la monooxygénase où elle s'accumule sous forme d'hydroperoxyflavine, à raison d'une molécule par dimère de ActVA. Ceci est rendu possible grâce à la forte affinité de la monooxygénase pour la flavine réduite mais aussi grâce au caractère limitant de la vitesse de décomposition de l'hydroperoxyflavine par rapport à la vitesse de sa formation.

Ce mécanisme original d'activation de l'oxygène présente deux différences fondamentales vis-à-vis du mécanisme décrit pour les flavoprotéines hydroxylases. D'une part, la présence du substrat à hydroxyler n'est pas nécessaire pour la formation de l'hydroperoxyflavine au

sein de ActVA. D'autre part, cet intermédiaire est bien plus stabilisé que dans le cas des flavoprotéines hydroxylases où il est uniquement observable par cinétique rapide.

Des résultats similaires ont été récemment obtenus *in vivo* pour l'hydroxylase à deux composants FAD-dépendante HpaB-HpaC d'*Escherichia coli* (Louie et coll, 2003). Il a été proposé que la forte stabilisation de l'hydroperoxyflavine par la monooxygénase HpaB, permettait de réguler de façon indirecte l'activité flavine réductase HpaC.

En présence de substrat à hydroxyler (4-Hpa), la flavine, réduite par HpaC, est transférée à la monooxygénase HpaB, où elle se transforme en hydroperoxyflavine et réagit très rapidement avec le substrat. Dans ces conditions, la flavine oxydée est constamment régénérée, et la réductase HpaC fonctionne à sa vitesse maximale. En revanche, en absence de substrat, la quasi totalité du FAD libre intracellulaire (~ 13 μM) est complexée sous forme FADOOH au sein de la monooxygénase, présente en excès vis-à-vis de la flavine (~ 122 μM) (Louie et coll, 2003). Dans ce cas, la concentration intracellulaire du cofacteur libre est inférieure au K_m de HpaC pour le FAD (3 μM) et son activité flavine réductase est fortement ralentie (Louie et coll, 2003).

La monooxygénase est donc capable de réguler indirectement l'activité flavine réductase de HpaC en contrôlant la concentration intracellulaire de flavine libre. Cela a l'avantage d'économiser les équivalents réducteurs du NAD(P)H qui ne seront consommés qu'en présence de substrat à hydroxyler.

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* pour le système ActVA-ActVB sont en accord avec cette notion et il est probable qu'au sein de *Streptomyces coelicolor*, l'activité réductase de ActVB soit régulée de la même manière par ActVA.

Cette régulation indirecte de l'activité flavine réductase semble être spécifique des hydroxylases flavine-dépendantes à deux composants. En effet, dans le cas des flavoprotéines hydroxylases comme la PHBH, l'étape de réduction de la flavine est directement régulée par le substrat p-OHB (Husain et coll, 1979). La fixation de ce dernier à proximité du site actif entraîne un changement de conformation de l'enzyme qui peut alors fixer le NAD(P)H et catalyser la réduction de son cofacteur FAD (Frederick et coll, 2001; Palfey et coll, 2002). En absence de p-OHB, cette réduction se réalise très lentement et dans un contexte physiologique, la fonction hydroxylase de l'enzyme PHBH est totalement inactivée.

Les mécanismes de régulation des flavoprotéines hydroxylases et des hydroxylases à deux composants sont donc fondamentalement différents. Cependant, ils ont en commun le pouvoir de contrôler très efficacement l'étape de réduction de la flavine en fonction de la quantité intracellulaire de substrat à hydroxyler. Dans les deux cas, cette régulation permet à la cellule d'économiser le pouvoir réducteur du NAD(P)H.

IV Activité hydroxylase du système ActVA-ActVB

IV.1 Caractérisation spectroscopique des substrats de ActVA

La dihydrokalafungine (DHK) a depuis longtemps été considérée comme le substrat naturel du système ActVA-ActVB (Cole et coll, 1987). Elle appartient à la famille des pyronaphthoquinones au même titre que la nanaomycine A (NNM-A), et D (NNM-D). Ces trois molécules possèdent deux à trois centres chiraux situés en position 3, 4 et 15 (schéma 6). La NNM-D est l'analogue lactonique de la NNM-A qui est l'énantiomère de la DHK.

La DHK et la NNM-D ne sont pas des molécules commerciales. La présence des centres chiraux rendent leurs synthèses fastidieuses et souvent peu rentables (Brimble et coll, 1997; Tatsuta et coll, 1985). Par ailleurs, il a été rapporté que ces deux molécules pouvaient être purifiées respectivement à partir des souches *Nocardia* et *Streptomyces rosa var. notoensis* (Imai et coll, 1989; Omura et coll, 1976). C'est ce qu'avait effectué le Dr. Steven Kendrew il y a une dizaine d'années dans le but d'étudier le fonctionnement de ActVA, suite à la première caractérisation de son partenaire, la réductase ActVB (Kendrew et coll, 1995). Ce projet n'ayant pas été mené à bien, Steven Kendrew a accepté de nous fournir la DHK, la NNM-A et la NNM-D en quantités suffisantes pour que nous puissions étudier l'activité du système ActVA-ActVB en présence de ces différents substrats.

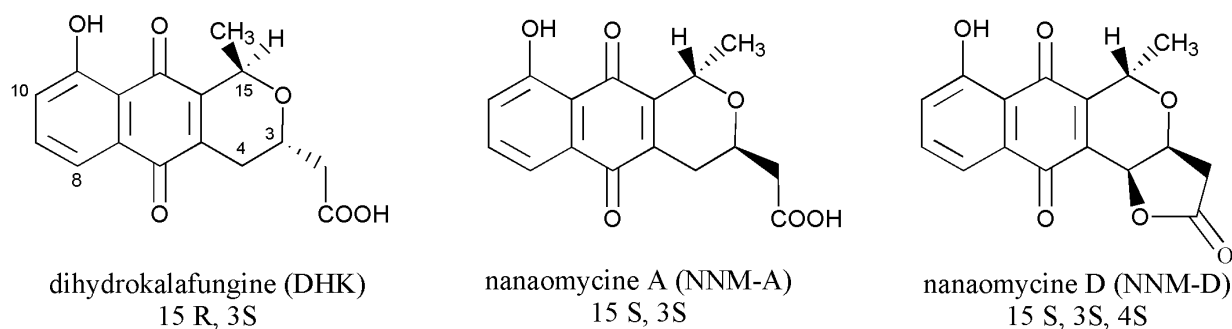


Schéma 6. Formules de Lewis des substrats pyronaphthoquinoniques.

La structure particulière de ces molécules, composée d'un cycle naphthoquinone couplé à un noyau pyrane, leur confère une signature spectroscopique remarquable dans le domaine de l'UV-visible. Celle-ci est dépendante du pH de la solution. A titre d'exemple, les spectres UV-visibles de la DHK obtenus à différents pH sont présentés figure 29.

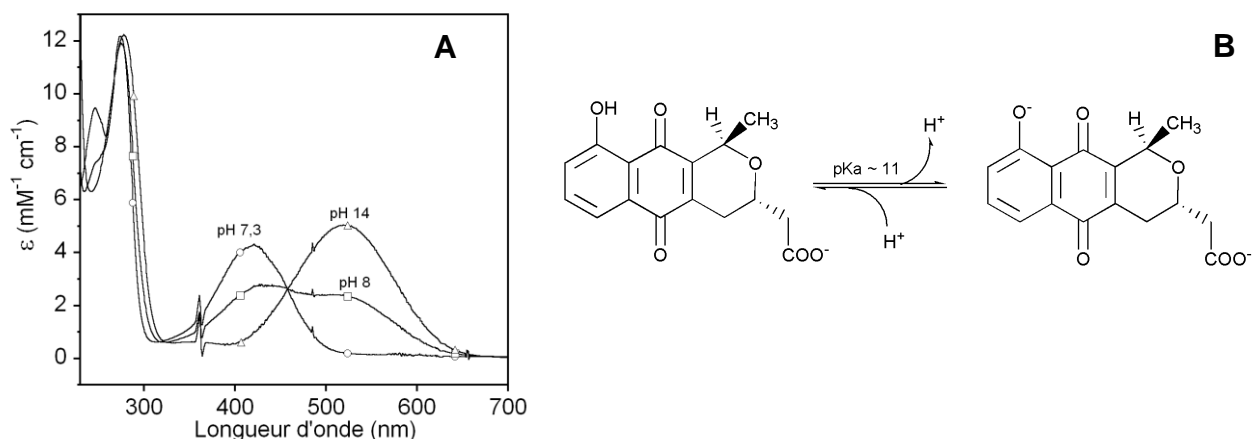


Figure 29. Spectres UV-visibles de la DHK à pH 7,3 (○), pH 8,0 (□) et pH 14,0 (Δ), (A). Equilibre acide/base entre les formes protonée et déprotonée de la DHK (B).

Ces molécules sont des couples acide/base, capables de donner et d'accepter des protons via leurs fonctions phénolique et acide carboxylique ($\text{pK}_a \sim 10,9$ et $5,9$ respectivement pour la NNM-A) (Tanaka et coll, 1975). Par ailleurs, le noyau quinone qu'elles contiennent, peut exister à l'état oxydé (quinone) et à l'état réduit à deux électrons (hydroquinone) (Tanaka et coll, 1982). Les spectres UV-visibles de ces deux états rédox sont très différents (figure 30). A pH neutre, la forme quinonique possède deux bandes d'absorption majoritaires centrées sur 274 et 423 nm alors que la forme hydroquinonique fait apparaître une seule bande centrée sur 353 nm avec un épaulement vers 340 nm (Tanaka et coll, 1982).

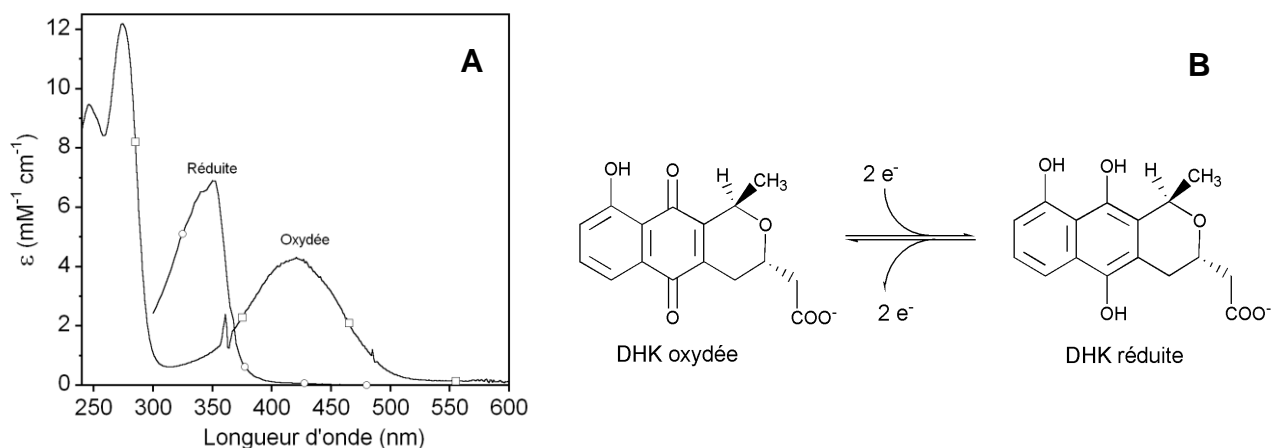


Figure 30. Spectres UV-visibles de la DHK oxydée (DHK_{ox}, □) et réduite à deux électrons (DHK_{red}, ○), en anaérobiose et en solution dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6 (A). Equilibre d'oxydoréduction entre les formes réduite et oxydée de la DHK (B).

IV.2 Cinétiques d'hydroxylation de la DHK et de la NNM-A suivies par spectroscopie UV-visible

L'activité hydroxylase du couple ActVA-ActVB vis-à-vis de la NNM-A, la NNM-D et la DHK, a été étudiée par spectroscopie UV-visible. Les conditions expérimentales ont été définies selon les critères suivants :

- ActVB doit fonctionner à l'état stationnaire afin de fournir en continu le FMN_{red}, nécessaire à la formation de l'espèce FMNOOH au sein de ActVA.
- ActVA doit être suffisamment concentrée pour fixer la DHK et ses analogues. Comme leur affinité pour la monooxygénase n'est pas connue, cette dernière sera ajoutée en excès par rapport aux substrats.
- La disparition des substrats pyronaphthoquinoniques et l'apparition de leurs produits doivent être détectables par spectroscopie UV-visible. La concentration initiale de ces substrats doit donc se situer aux alentours de la dizaine de μM .

Selon ces différents critères, un mélange contenant 36 μM de DHK, 4 μM de FMN_{ox}, 200 μM de NADH, et 50 μM de ActVA est réalisé en aérobiose ($\sim 200 \mu\text{M}$ d' O_2). La réaction est initiée par l'ajout de ActVB (155 nM final). La figure 31A montre les spectres enregistrés au début et en fin de réaction (après 250 s). Le spectre final ne contient plus la bande d'absorption à 340 nm, synonyme de la disparition totale du NADH. Par ailleurs, il apparaît une absorption supplémentaire au delà de 450 nm. Ceci semble indiquer qu'une nouvelle espèce est formée durant cette réaction. Son spectre UV-visible, obtenu en retranchant le spectre initial au spectre final, fait apparaître une bande majoritaire centrée sur 507 nm ainsi que plusieurs épaulements au-delà de 550 nm (figure 31B).

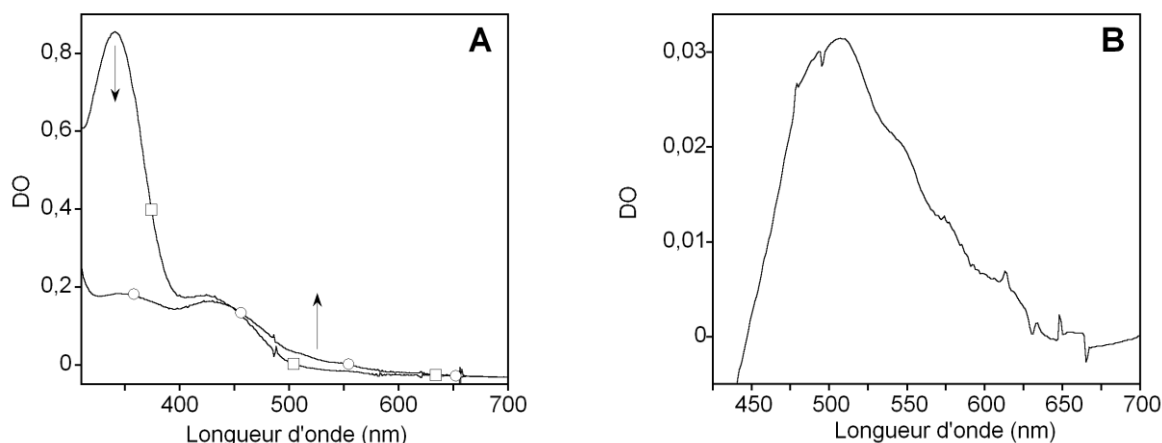


Figure 31. Activité hydroxylase du système ActVA-ActVB suivie par spectroscopie UV-visible. Un mélange contenant 36 μM de DHK, 4 μM de FMN_{ox} et 200 μM de NADH dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé en aérobiose à 25°C, en présence de 50 μM de ActVA et 155 nM de ActVB. (A) : spectres UV-visibles du mélange enregistrés avant l'ajout de ActVB (\square) et 250 s après l'ajout de ActVB, lorsque l'absorbance du mélange n'évolue plus (\circ). (B) spectre de différence (spectre final – spectre initial).

La figure 32 présente l'évolution de l'absorbance à 340 et 507 nm au cours du temps.

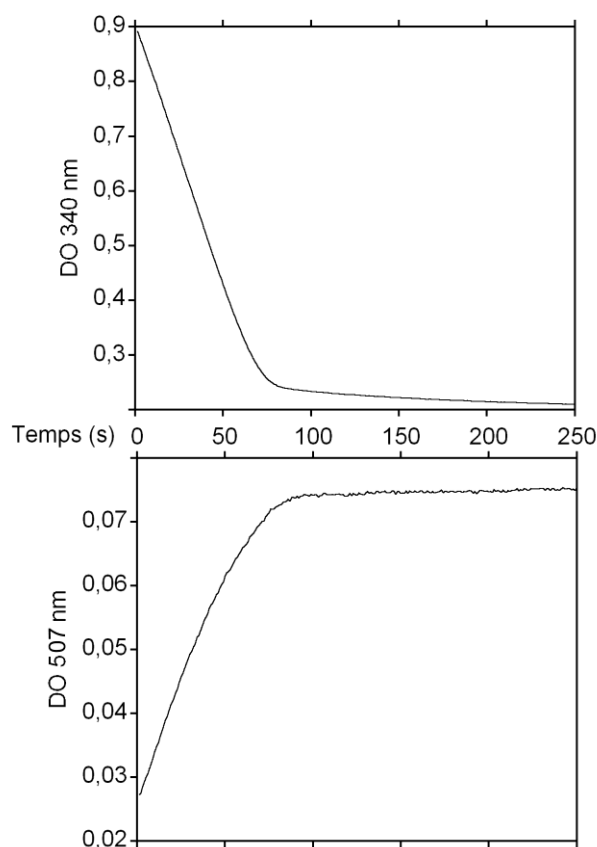


Figure 32. Activité hydroxylase du système ActVA-ActVB suivie par spectroscopie UV-visible. Un mélange contenant 36 μM de DHK, 4 μM de FMN_{ox} et 200 μM de NADH dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé en aérobiose à 25°C, en présence de 50 μM de ActVA et 155 nM de ActVB. L'évolution de l'absorbance à 340 et 507 nm est enregistrée au cours du temps.

La diminution de l'absorbance à 340 nm, synonyme de l'oxydation du NADH, est corrélée à l'augmentation de l'absorbance à 507 nm (figure 31B), caractéristique de l'apparition de la

nouvelle espèce. Lorsque tout le NADH est oxydé (~ 75 s), l'absorbance à 507 nm cesse d'augmenter et se stabilise à sa valeur finale.

Ce résultat indique que l'apparition de cette nouvelle espèce spectroscopique est directement liée à l'oxydation du NADH, catalysée par ActVB. De plus, lorsque cette expérience est réalisée en absence de ActVA, aucune variation d'absorbance n'est observée à 507 nm. La présence simultanée de ActVB et ActVA est donc nécessaire à l'apparition de ce nouveau produit.

Afin d'identifier la nature de ce composé, nous avons analysé le mélange réactionnel par HPLC-MS.

IV.3 Identification du produit de la réaction par HPLC et HPLC-MS

Le produit de la réaction impliquant la DHK et le système ActVA-ActVB est analysé par HPLC et par HPLC-MS. La figure 33A illustre le chromatogramme du mélange réactionnel obtenu après purification HPLC sur colonne C18. La DHK et le produit de la réaction sont élués respectivement à 7,4 et 7,7 min. Le spectre UV-visible du produit (figure 33B, Δ) présente un maximum d'absorption centré sur 507 nm et deux épaulements situés à 482 et 544 nm. Ce spectre est similaire à celui qui a été identifié précédemment (figure 31B), et significativement différent de ceux de la DHK (\square) et de l'actinorhodine (\circ). Le calcul du coefficient d'extinction molaire du produit obtenu est détaillé plus bas.

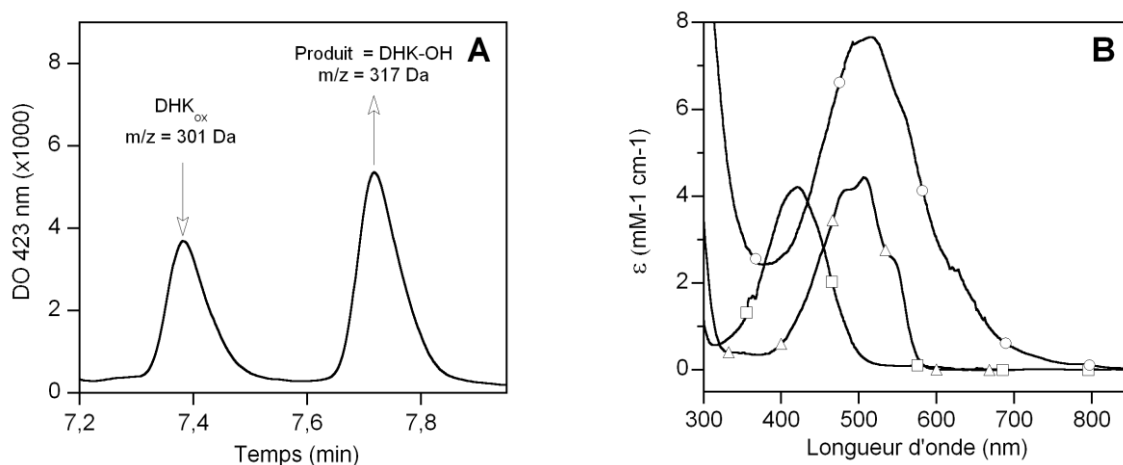


Figure 33. Identification du produit de réaction par HPLC-MS. Un mélange de 4 μ M de FMN_{ox}, 200 μ M de NADH, 36 μ M de DHK, 50 μ M de ActVA et 155 nM de ActVB dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé en aérobiose ($[O_2] \sim 200 \mu$ M) à 25°C. Lorsque tout le NADH est oxydé (~ 100 s), le mélange réactionnel est analysé par HPLC-MS en mode MRM (Multiple Reaction monitoring Mode) paramétré pour détecter la présence de DHK et du produit de la réaction en mode négatif. (A) : chromatogramme HPLC ; les flèches indiquent le sens d'évolution des pics au cours de la réaction. (B) : spectres UV-visibles de l'actinorhodine (\circ), de la DHK (\square) et du produit de la réaction (Δ).

L'analyse de ce nouveau produit par spectrométrie de masse en mode négatif, a permis de lui attribuer une masse moléculaire de 317 Da. Celle-ci correspond exactement à la masse de la DHK additionnée d'un oxygène ($301 + 16$ Da). Ce résultat montre clairement que, dans nos conditions expérimentales, le produit de la réaction n'est pas l'actinorhodine (633 Da) mais plutôt l'analogue hydroxylé de la DHK, que nous nommerons par la suite DHK-OH.

Comme le montre la figure 33A, cette réaction n'est pas totale. Des additions successives de NADH ont donc été effectuées afin d'hydroxyler la totalité de la DHK. Ces multiples ajouts font disparaître le pic de la DHK en même temps qu'ils font augmenter l'aire du pic de la DHK-OH, jusqu'à une valeur maximale et sans changer la forme de son spectre. En faisant l'hypothèse que la DHK-OH est le seul produit d'oxydation formé durant cette réaction, le coefficient d'extinction molaire de ce produit peut être calculé pour chaque longueur d'onde de son spectre UV-visible (figure 33B, Δ). Le coefficient d'extinction molaire de la bande majoritaire de la DHK-OH, située à 507 nm, est similaire à celui de la DHK ($4,4$ et $4,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivement). Cette propriété a été également observée pour des molécules analogues telles que la 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone et la 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone qui présentent des spectres respectivement comparables à ceux de la DHK et de la DHK-OH (figure 34) (Khan et coll, 2005).

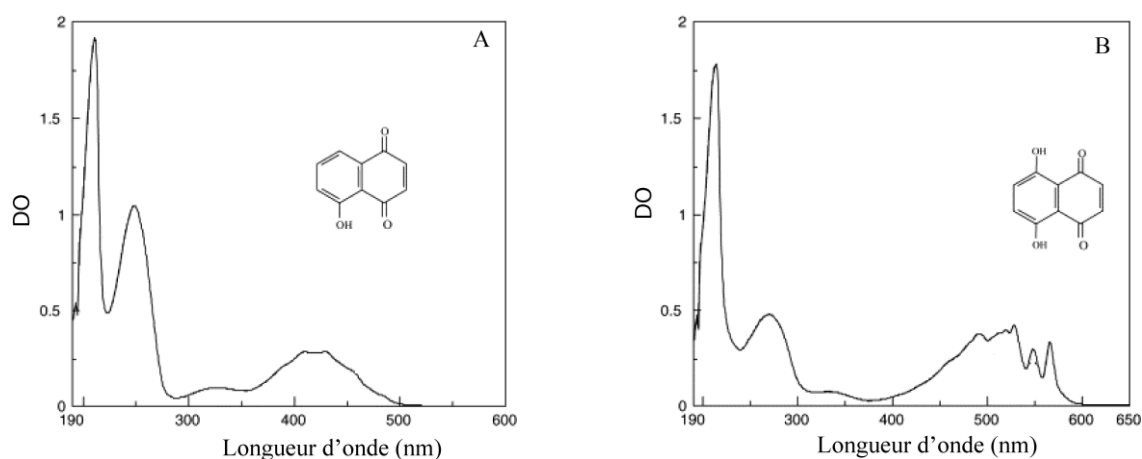


Figure 34. Spectres UV-visibles de la 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (A) et de la 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (B) (Khan et coll, 2005).

Les spectres UV-visibles de ces deux composés montrent en effet que l'hydroxylation de la 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone au niveau de son cycle phénolique entraîne un déplacement bathochromique de la bande d'absorption de lumière visible sans variation significative de son intensité.

Ces similitudes spectrales suggèrent que l'hydroxylation de la DHK a lieu au niveau de son cycle phénolique, la position de cette addition restant encore à définir.

Les mêmes expériences ont été réalisées en présence de la NNM-A, l'énantiomère de la DHK (schéma 6). Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés en présence de DHK : un seul produit est détecté en fin de réaction. Celui-ci possède les mêmes propriétés spectrales que la DHK-OH (figure 35). Il semble donc que la NNM-A soit également hydroxylée en NNM-A-OH durant cette réaction. Par conséquent, la NNM-A est également un substrat du système ActVA-ActVB.

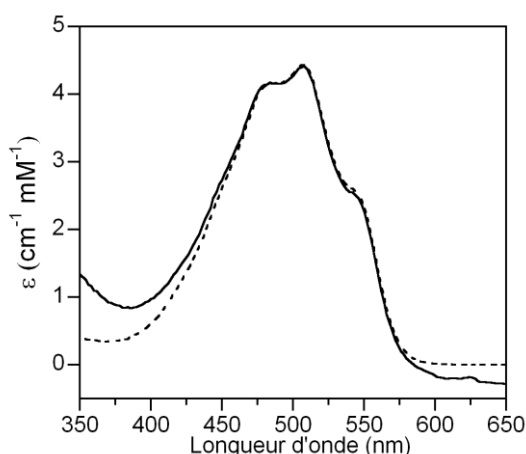


Figure 35. Spectres UV-visibles de la DHK-OH (trait pointillé) et de la NNM-A-OH (trait continu).

Depuis longtemps, les deux enzymes ActVA et ActVB sont connues pour être impliquées dans l'hydroxylation et la dimérisation de deux unités de DHK pour former l'actinorhodine (Cole et coll, 1987; Rudd et coll, 1979). Jusqu'à présent, aucune autre étude n'a permis de confirmer cette idée et le mécanisme selon lequel la DHK est transformée en actinorhodine est inconnu. Pour la première fois, nos résultats indiquent que le système ActVA-ActVB est capable de catalyser *in vitro* l'hydroxylation de la DHK. En revanche, de manière tout à fait surprenante, ce système n'est pas en mesure de catalyser la dimérisation de la DHK-OH dans nos conditions expérimentales. Il semble donc qu'une troisième enzyme, possédant une activité dimérase, soit nécessaire pour finaliser la synthèse de cet antibiotique.

IV.4 Rendement de l'activité hydroxylase du système ActVA-ActVB

Nous venons de montrer que le système ActVA-ActVB est capable de réaliser l'hydroxylation de la DHK en présence de NADH et d'oxygène. L'équation bilan de cette réaction est présentée ci-dessous (schéma 7).

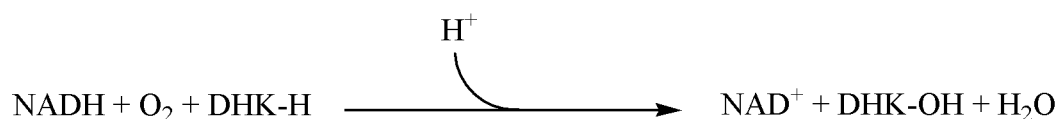


Schéma 7. Activité hydroxylase du système ActVA-ActVB : réaction bilan.

Le rendement de cette réaction peut être défini comme le rapport entre la quantité de DHK-OH formée et la quantité de NADH consommée. Ce rendement est de 100 % lorsqu'une molécule de NADH entraîne la formation d'une molécule de DHK-OH.

Expérimentalement, ce n'est pas le cas. En effet, nous avons vu précédemment que même en présence d'un excès de NADH, la DHK n'était que partiellement hydroxylée (figure 33A). Une mauvaise affinité de ce substrat pour ActVA pourrait expliquer ce faible rendement. La valeur de ce rendement d'hydroxylation a donc été étudiée en fonction de la quantité de ActVA selon le protocole décrit dans la figure 33. La détermination par HPLC, de la quantité de produit, permet de calculer le rapport entre la quantité de produit formé et la quantité de NADH consommé. La figure 36 présente les résultats que nous avons obtenus avec la DHK et la NNM-A. Le rendement d'hydroxylation augmente en fonction de la quantité de ActVA présente dans l'essai. Cependant, en présence d'un large excès de ActVA par rapport à la DHK, celui-ci atteint une valeur maximale d'environ 9 %. Lorsque la même expérience est réalisée en présence de NNM-A, la valeur maximale de rendement obtenue est de 4 %.

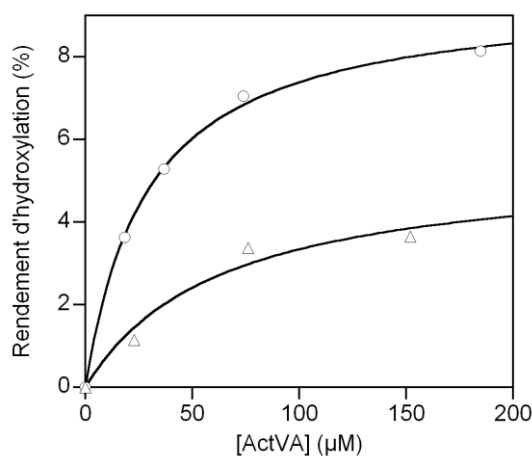


Figure 36. Evolution du rendement d'hydroxylation en fonction de la concentration de ActVA. Un mélange contenant 4 μM de FMN_{ox}, 36 μM de DHK ou NNM-A et 200 μM de NADH dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé en aérobie ([O₂] ~ 200 μM) à 25°C, en présence de quantités variables de ActVA. La réaction est initiée par l'ajout de ActVB (155 nM final) puis suivie par spectroscopie UV-visible. Lorsque la totalité du NADH est consommée (~ 100 s), la concentration des produits est déterminée et le rendement d'hydroxylation obtenu en présence de DHK (○) et de NNM-A (Δ) est calculé selon la formule suivante :
rendement = [produit hydroxylé formé] / [NADH initial] × 100.

Les rendements d'hydroxylation obtenus avec la DHK et la NNM-A sont donc très faibles même en présence d'un large excès de ActVA. Par conséquent, l'affinité de ActVA pour ces deux substrats ne semble pas être le paramètre limitant de cette réaction d'hydroxylation. On

peut donc penser qu'il existe des réactions secondaires capables de diminuer le rendement réactionnel.

IV.5 Origine du faible rendement d'hydroxylation

La coordination des activités réductase et monooxygénase est assurée par le FMN. Cette navette rédox récupère les électrons du NADH via l'activité flavine réductase de ActVB, les transporte à travers la solution sous forme FMN_{red} libre et les transfère à l'oxygène moléculaire au sein du site actif de ActVA pour produire la DHK-OH. Ainsi, la réaction d'hydroxylation est réalisée grâce au « couplage » de l'activité flavine réductase de ActVB et de l'activité monooxygénase de ActVA. Dans un cas idéal, le couplage est total : une molécule de DHK-OH est formée pour une molécule de NADH consommée. Néanmoins, dans nos conditions expérimentales, les faibles rendements obtenus témoignent d'un découplage important entre les deux activités.

Les trois phénomènes, pouvant être à l'origine de ce découplage ont été étudiés. Il s'agit de :

- l'oxydation du FMN_{red} libre par l'oxygène moléculaire.
- l'oxydation du FMN_{red} libre par les substrats pyronaphthoquinoniques.
- l'oxydation du complexe ActVA: FMN_{red} par les substrats pyronaphthoquinoniques.

IV.5.A Oxydation du FMN_{red} par l'oxygène moléculaire

Comme cela a été décrit en introduction, la flavine libre réduite est capable de réduire très rapidement l'oxygène moléculaire à un électron pour former du superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$ et de la flavosemiquinone FIH° (Bruice, 1984; Massey, 1994; Muller, 1987). Il est donc tout à fait probable que ce type de réaction se réalise lorsque la flavine libre réduite est transférée de ActVB vers ActVA (schéma 8). Dans ce cas, l'activation de l'oxygène n'est pas contrôlée par ActVA et l'espèce FMNOOH nécessaire à l'hydroxylation de la DHK n'est pas formée.

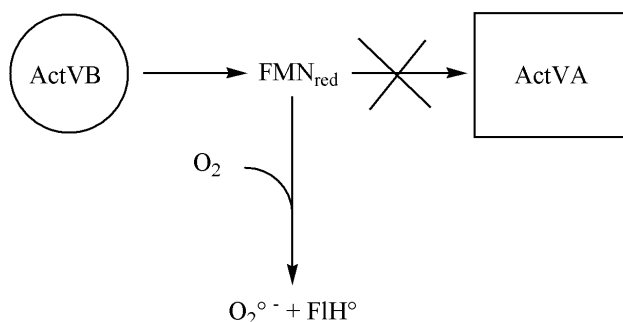


Schéma 8. Hypothèse de l'inhibition du transfert de la flavine réduite de ActVB vers ActVA, par l'oxygène moléculaire.

Bien que l'oxydation de la flavine par l'oxygène moléculaire soit thermodynamiquement très favorable, elle ne semble pas être la cause prépondérante du découplage des deux activités. La figure 26 montre en effet que le FMN_{red} est transféré en totalité à ActVA puis transformé en une espèce FMNOOH bien que la concentration d'oxygène moléculaire avoisine les 200 μM . D'un point de vue cinétique, le transfert du FMN_{red} libre vers ActVA est donc favorisé par rapport à sa réoxydation par l'oxygène moléculaire.

Il doit donc exister d'autres sources de découplage à l'origine du faible rendement d'hydroxylation de la DHK.

IV.5.B Oxydation du FMN_{red} libre par les substrats pyronaphthoquinoniques

Les flavines réduites sont aussi d'excellents agents réducteurs des complexes ferriques mais aussi des quinones (Fontecave et coll, 1994; Hemmerich et coll, 1977). Nous avons vu plus haut que les pyronaphthoquinones (DHK et NNM-A), utilisées comme substrats du système ActVA-ActVB, existent à l'état réduit (hydroquinonique) et oxydé (quinonique, figure 30). Il est donc tout à fait possible que ces molécules, présentes à l'état oxydé dans les expériences précédentes, puissent réagir avec la flavine réduite générée par ActVB. Afin de vérifier cette hypothèse, l'expérience suivante a été réalisée. Une solution contenant 50 μM de FMN réduit par voie photochimique, est mélangée en anaérobiose avec environ 0,5 équivalents de DHK oxydée (20 μM final). La réaction est suivie par spectroscopie UV-visible (figure 37).

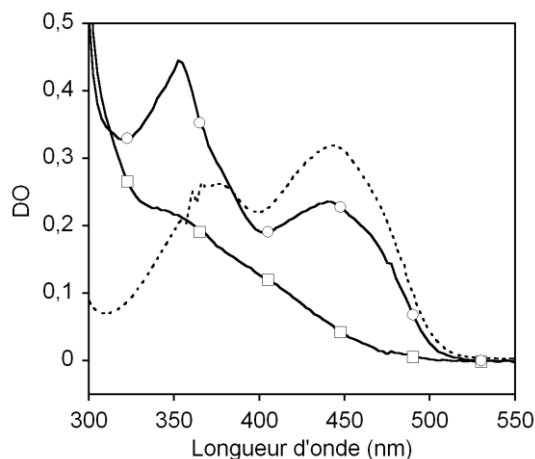


Figure 37. Réduction de la DHK par le FMN_{red} . 50 μM de FMN_{red} en solution dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, sont incubés à 18°C en anaérobiose ($[\text{O}_2] < 5 \text{ ppm}$). 20 μM de DHK_{ox} (concentration finale) sont ensuite ajoutés et la réaction est suivie par spectroscopie UV-visible. Spectres enregistrés avant (□) et immédiatement après l'ajout de la DHK_{ox} (○). Le spectre du mélange final exposé à l'air est représenté en pointillé.

La forme du spectre enregistré immédiatement après l'ajout de la DHK fait apparaître deux nouvelles bandes d'absorption centrées sur 445 et 353 nm. Ceci indique que du FMN_{ox} (445 nm) et de la DHK réduite (353 nm, figure 30) se sont formés très rapidement pendant le mélange. La différence d'intensité calculée à 445 et à 353 nm entre le spectre final et le spectre initial permet de calculer que 20 μM de FMN_{ox} et 20 μM de DHK_{red} ont été générés durant cette expérience. Enfin, lorsque ce mélange final est exposé à l'air, la totalité de la flavine et de la DHK présentes à l'état réduit sont immédiatement réoxydées (figure 37).

Le FMN_{red} est donc capable de réduire très efficacement les pyronaphthoquinones selon une stoechiométrie 1:1. La forme hydroquinone (réduite) produite durant cette réaction est rapidement réoxydée par l'oxygène, libérant vraisemblablement du superoxyde (Muller, 1987).

Les formes quinones de la DHK et de la NNM-A utilisées dans nos expériences précédentes effectuées à l'état stationnaire (figure 36) sont donc à priori capables d'oxyder le FMN_{red} lorsqu'il est transféré de ActVB vers ActVA (schéma 9).

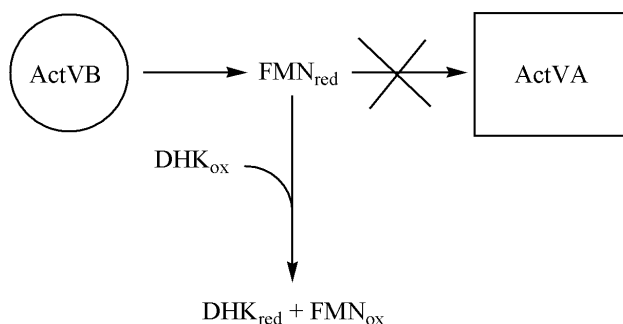


Schéma 9. Hypothèse de l'inhibition du transfert de la flavine réduite de ActVB vers ActVA par la DHK_{ox}.

Dans ce cas, le FMN_{red} peut être réoxydé avant d'atteindre le site actif de ActVA. Cette réaction peut donc découpler les activités réductase de ActVB et monooxygénase de ActVA et ainsi diminuer le rendement réactionnel d'hydroxylation. Une troisième et dernière hypothèse sur l'origine de ce découplage a néanmoins été explorée.

IV.5.C Oxydation du complexe ActVA:FMN_{red} par les substrats pyronaphthoquinoniques

Pour catalyser la réaction d'hydroxylation, ActVA doit être capable de réunir le FMN_{red} et la DHK_{ox} (forme quinone) au sein de son site actif. Comme cela a été montré en solution (figure 37) il est fort probable que la DHK_{ox} réagisse avec le FMN_{red} avant que ce dernier puisse former l'intermédiaire hydroperoxyflavine en réagissant avec l'O₂ (schéma 10).

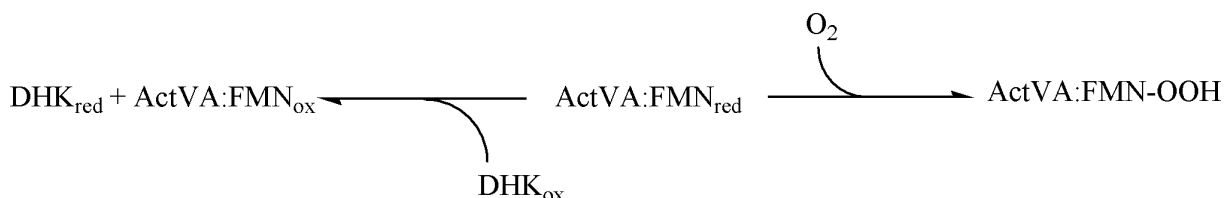


Schéma 10. Hypothèse de l'inhibition de la formation de l'intermédiaire hydroperoxyflavine par la DHK_{ox} au sein du site actif de ActVA.

Afin de tester cette hypothèse, l'expérience suivante a été réalisée. Une solution de FMN_{red} (10 μM), totalement complexée par ActVA (28 μM), est mélangée en anaérobiose avec 1 équivalent de DHK_{ox} vis-à-vis de la flavine et la réaction est suivie par spectroscopie UV-visible (figure 38).

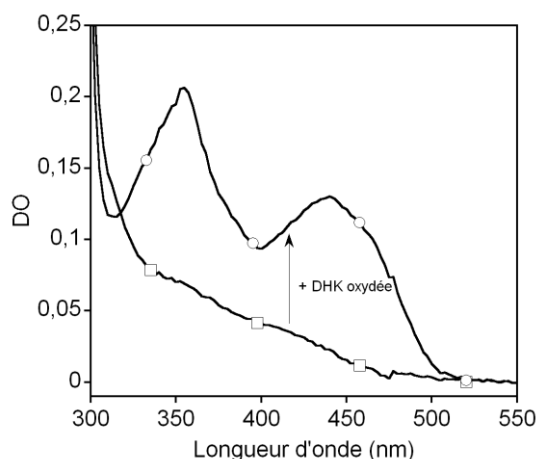


Figure 38. Réduction de la DHK par le complexe ActVA:FMN_{red}. Un mélange contenant 10 μ M de FMN_{red}, 28 μ M de ActVA en solution dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé à 18°C en anaérobiose ($[O_2] < 5$ ppm). 10 μ M de DHK_{ox} (concentration finale) sont ensuite ajoutés et la réaction est suivie par spectroscopie UV-visible. Spectres enregistrés avant l'ajout de la DHK (\square) et à la fin de la réaction (\circ).

La forme du spectre, enregistré 1 min après l'ajout de la DHK_{ox} fait apparaître deux bandes d'absorption à 353 et 445 nm. Ceci indique que du FMN_{ox} (445 nm) et de la DHK réduite (353 nm) se sont formés très rapidement pendant le mélange. La différence d'intensité calculée à 445 nm entre le spectre final et le spectre initial nous permet de calculer que 10 μ M de FMN_{ox} se sont formés durant cette expérience. Ce résultat montre que le FMN_{red} totalement complexé par ActVA est entièrement oxydé par la DHK_{ox}. Cette réaction peut donc, à priori, participer au découplage du système, en empêchant la formation de l'intermédiaire FMNOOH nécessaire à l'hydroxylation du substrat.

D'après le schéma 10, l'ampleur du découplage provoqué par cette réaction, doit être dépendante des quantités relatives de la DHK_{ox} et d'O₂. On peut logiquement penser que plus la quantité d'O₂ sera grande par rapport à celle de la DHK_{ox}, plus la réaction d'hydroxylation sera favorisée. Cette hypothèse a été testée dans la section suivante.

IV.6 L'effet oxygène

L'effet de la concentration d'oxygène sur le rendement d'hydroxylation de la DHK a été étudié en absence de ActVB et dans des conditions où un seul cycle catalytique est réalisé. Le complexe ActVA:FMN_{red} (50 et 20 μ M respectivement) est tout d'abord formé en anaérobiose. La réaction est ensuite initiée par l'ajout d'une solution de DHK oxydée (10 μ M final) contenant des quantités croissantes d'oxygène (de 28 à 85 μ M final). Une minute après cet ajout, le mélange est injecté sur une colonne C18 et ses différents constituants sont séparés par HPLC afin de déterminer les quantités de DHK et DHK-OH présentes en fin de réaction. Les chromatogrammes obtenus, en analysant l'élution à plusieurs longueurs d'onde, font

clairement apparaître que la DHK-OH est le seul produit formé au cours de ces expériences. La figure 39 présente l'un des chromatogrammes obtenus.

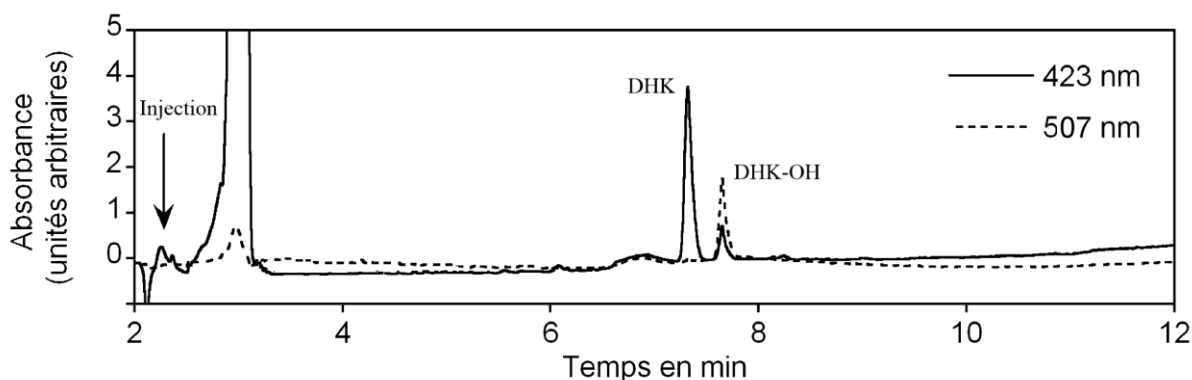


Figure 39. Détermination des quantités de substrat et de produit de la réaction par HPLC. Un mélange contenant 20 μM de FMN_{red} et 50 μM de ActVA en solution dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé en anaérobiose à 18°C. La forme quinonique de la DHK (10 μM final) contenant 50 μM d'oxygène (concentration finale) est ensuite ajoutée. En fin de réaction, la DHK et la DHK-OH sont séparées par HPLC et détectées respectivement à 423 et 507 nm.

ActVA est donc capable, en présence du FMN_{red}, de catalyser l'hydroxylation de la DHK en absence de ActVB. Ceci n'est pas étonnant puisque le FMNOOH qui permet cette hydroxylation, peut être formé à partir du complexe ActVA:FMN_{red} sans nécessiter la présence de ActVB (figure 20).

La figure 40 montre l'évolution des quantités de DHK et DHK-OH présentes en fin d'expérience, en fonction de la quantité d'O₂ introduite au début de la réaction. L'évolution des concentrations de ces deux espèces, présente deux phases distinctes. Dans la première phase, la quantité de DHK-OH produite augmente en fonction de la concentration d'O₂. Cette évolution atteint un maximum pour une concentration de 28 μM d'O₂. Au-delà de cette valeur, la quantité de produit formé diminue et devient nulle pour une valeur de 85 μM d'O₂. La première phase est tout à fait cohérente avec le schéma 10 présenté précédemment. L'augmentation de la quantité d'oxygène favorise la formation de l'intermédiaire FMNOOH et permet d'augmenter le rendement d'hydroxylation de la DHK. En revanche, l'évolution surprenante de la seconde phase ne peut pas être expliquée par ce schéma. La décroissance de la quantité de produit formé (DHK-OH), n'est pas due à une décomposition de la DHK-OH puisque la quantité de substrat non transformé augmente en fonction de la concentration d'oxygène. Il semble donc que la réaction d'hydroxylation soit totalement inhibée au-delà d'une certaine quantité d'O₂.

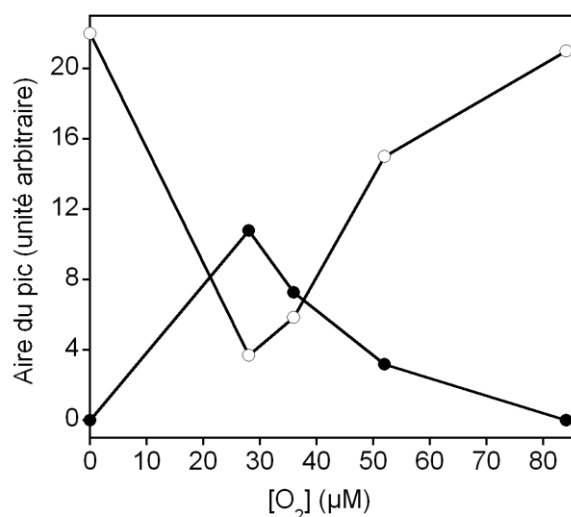


Figure 40. Inhibition de l'activité hydroxylase de ActVA par l'oxygène. Un mélange contenant 20 µM de FMN_{red} et 50 µM de ActVA en solution dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé en anaérobiose ($[O_2] < 5$ ppm) à 18°C. La forme quinonique de la DHK (10 µM final) contenant différentes quantités d'oxygène (28 à 85 µM final), est ensuite ajoutée. En fin de réaction, la DHK et la DHK-OH sont séparées par HPLC et détectées respectivement à 423 et 507 nm. Les aires des pics HPLC correspondant à la DHK (○) et à la DHK-OH (●), sont intégrées puis reportées en fonction de la quantité d'oxygène utilisée.

L'idée la plus plausible pour expliquer ce phénomène serait de considérer que la DHK_{red} est le véritable substrat de ActVA. Le raisonnement logique menant à cette hypothèse est décrit ci-dessous.

Nous avons vu dans le schéma 10 que, au sein du site actif de ActVA, le FMN_{red} et la DHK_{ox} pouvaient très rapidement réagir pour former la DHK_{red} (figure 38). De plus, le FMN_{red} complexé à ActVA est également capable de réagir avec l'oxygène pour former un intermédiaire hydroperoxyflavine (figure 20). Dans les conditions expérimentales de l'expérience présentée figure 40, ces deux réactions peuvent se réaliser car le FMN_{red} est en excès par rapport à la DHK_{ox} (20 et 10 µM respectivement, schéma 11). On peut donc penser que la flavine réduite présente en excès est capable de former à la fois du FMNOOH (i) mais aussi de la DHK_{red} (ii) (schéma 11).

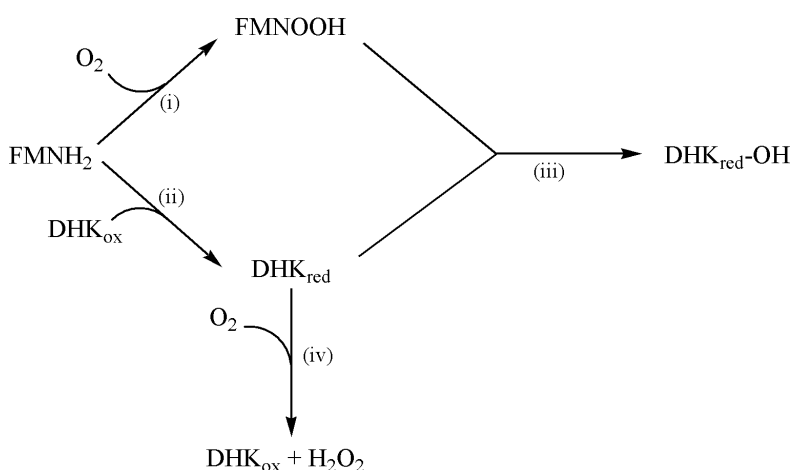


Schéma 11. Hypothèse proposée pour expliquer l'inhibition de l'hydroxylation par un excès d'oxygène.

Si l'on considère que la DHK_{red} est le seul substrat de ActVA, on peut alors expliquer l'inhibition de la réaction d'hydroxylation observée à forte concentration d' O_2 : l'oxygène en excès, oxyde la DHK_{red} en DHK_{ox} (iv) et empêche toute réaction avec le FMNNOOH (iii).

Cette hypothèse est testée dans la partie suivante.

IV.7 Spécificité de ActVA vis-à-vis de l'état rédox des substrats pyronaphthoquinoniques

IV.7.A Etude du rendement d'hydroxylation en fonction de l'état rédox du substrat

Les rendements d'hydroxylation de la DHK_{red} et de la DHK_{ox} , ont été comparés. Cette étude a aussi été réalisée avec l'énantiomère de la DHK, la NNM-A et un analogue structural, la NNM-D (schéma 6).

La détermination des rendements d'hydroxylation des substrats oxydés (dans leur forme quinone), est réalisée de la manière suivante (schéma 12). Une solution de FMN_{red} (10 μM) totalement complexé par ActVA (50 μM), est tout d'abord préparée en anaérobiose. La réaction est initiée par l'ajout d'une solution oxygénée ($[\text{O}_2] \sim 100 \mu\text{M}$ final) contenant 1 équivalent de substrat quinone par rapport au FMN_{red} . 1 min après cet ajout, le mélange réactionnel est analysé en aérobiose par HPLC en détectant la présence du produit à 507 nm. L'intégration de l'aire du pic obtenu, permet de déterminer la quantité de produit formé. Le rendement d'hydroxylation, défini comme le rapport entre la quantité de produit formé et la quantité de FMN_{red} présent en début de réaction (10 μM), est déterminé pour chaque expérience (schéma 12).

Pour éviter que la flavine ne réduise le substrat durant cette expérience, ce dernier est ajouté en quantité stoechiométrique par rapport à la flavine réduite. De plus, un large excès d'oxygène est ajouté pour favoriser la formation de l'hydroperoxyflavine

Les rendements d'hydroxylation des substrats réduits, sont calculés en suivant le même protocole. En revanche, comme ces substrats s'oxydent à l'oxygène, ils sont préincubés en anaérobiose en présence de ActVA et du FMN_{red}. La réaction est alors initiée par l'ajout de la solution oxygénée. Ces deux protocoles sont schématisés ci-dessous.

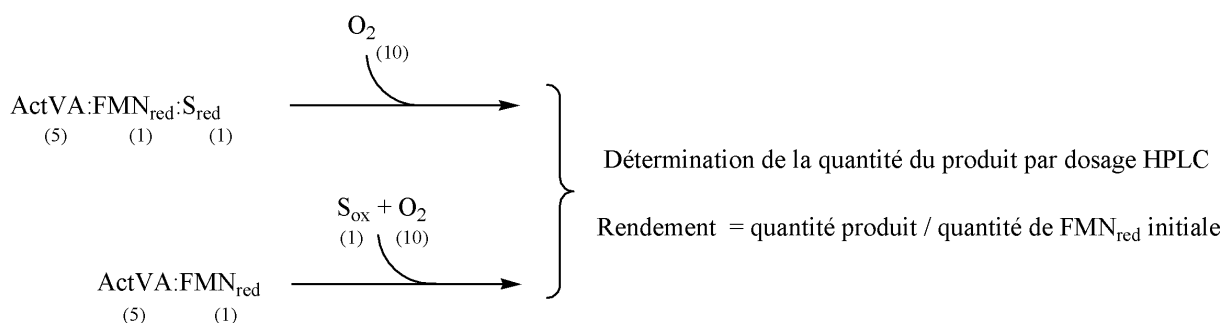


Schéma 12. Détermination du rendement d'hydroxylation des substrats oxydés (formes quinones) et réduits (formes hydroquinones) par le système ActVA:FMN_{red}:O₂. Les quantités relatives des différents composants sont indiquées entre parenthèses. S_{ox} et S_{red} correspondent respectivement aux substrats sous forme quinone et hydroquinone.

Dans toutes les expériences effectuées en présence des substrats sous forme hydroquinone, un seul pic majoritaire est observé sur le chromatogramme. Il correspond à la forme quinone du produit formé au cours de la réaction. En effet, les formes hydroquinones sont, dans tous les cas, réoxydées par l'oxygène moléculaire durant l'analyse HPLC.

Les rendements obtenus pour les trois substrats sont reportés dans le tableau II.

	DHK		NNM-A		NNM-D	
	Ox	Red	Ox	Red	Ox	Red
Rendements d'hydroxylation (%)	0	90	0	30	0	22

Tableau II. Rendements d'hydroxylation en fonction de la nature du substrat pyronaphthoquinonique et de son état rédox (Ox : quinone, Red : hydroquinone).

Les valeurs numériques présentées correspondent aux calculs du rapport [Produit formé après 1 minute] / [FMN_{red} initiale] × 100. Toutes les expériences sont réalisées en boîte à gants avec 50 μM de ActVA, 10 μM de substrat pyronaphthoquinonique, 10 μM de FMN_{red} et 100 μM d'oxygène.

Les résultats de ces expériences montrent clairement que seuls les substrats réduits sont hydroxylés. L'hypothèse formulée précédemment est donc vérifiée : l'activité hydroxylase de ActVA est strictement spécifique des substrats réduits. Cette propriété étonnante permet d'expliquer les rendements d'hydroxylation médiocres obtenus précédemment avec les substrats oxydés (figure 36). Dans ces expériences, la DHK_{ox} et la NNM-A_{ox}, ajoutées en tant

que substrats doivent être préalablement réduites pour être hydroxylées par le système ActVA-ActVB. Comme nous l'avons vu précédemment, cette étape de réduction est vraisemblablement assurée par le FMN_{red}, lorsqu'il est transféré de ActVB vers ActVA (figure 37) mais également lorsqu'il est situé au sein du site actif de ActVA (figure 38). Par conséquent, l'hydroxylation d'un substrat oxydé nécessite théoriquement deux molécules de NADH. Ces dernières permettent, via l'activité réductase de ActVB, la réduction de deux molécules de FMN_{ox}. Une première molécule de FMN_{red} est utilisée pour former le FMNOOH au sein de ActVA et une deuxième molécule de FMN_{red} est utilisée pour réduire le substrat oxydé. Le rendement d'hydroxylation théorique devrait donc être de 50 %. Cependant, expérimentalement, il n'est que de 8 % pour la DHK_{ox} (figure 36). Ceci s'explique par le fait que l'oxygène, présent en excès (200μM) dans ces expériences, peut réoxyder très rapidement les substrats réduits avant que ces derniers ne réagissent avec le FMNOOH. Dans ces conditions expérimentales, une quantité nettement supérieure à 2 molécules de NADH est donc nécessaire pour hydroxyler une molécule de DHK_{ox}.

IV.7.B Spécificité rédox de ActVA : interprétation et hypothèse mécanistique

Comment interpréter la différence de réactivité des deux états rédox du substrat ?

Un des schémas les plus plausibles pour expliquer le mécanisme de cette réaction, consiste en une attaque nucléophile du groupement hydroperoxo (électrophile) du FMNOOH par un doublet aromatique (nucléophile) du noyau phénol de la DHK. En règle générale, les électrons des doublets aromatiques ne sont pas répartis de manière homogène au sein du cycle phénolique. Ils se localisent préférentiellement sur les carbones situés en ortho (C10) ou para (C8) de la fonction alcool phénolique (schéma 13A). La réaction d'hydroxylation peut donc être vraisemblablement réalisée au niveau du C8 ou du C10 de la DHK (schéma 13B).

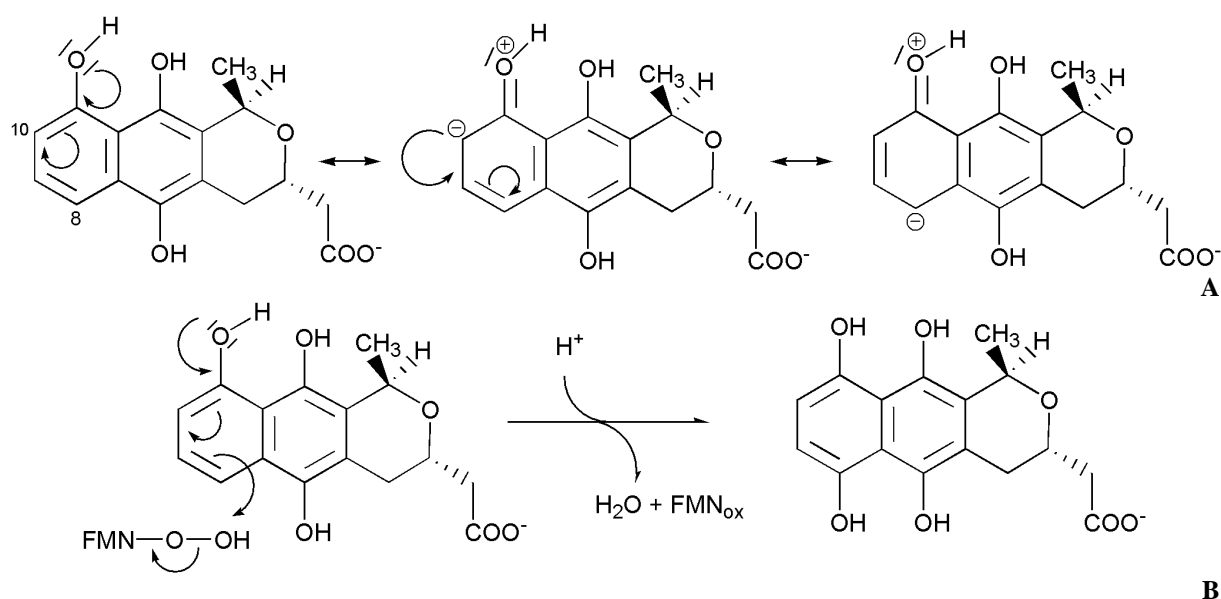


Schéma 13. Formules limites de la DHK_{red} (A). Hypothèse mécanistique de l'hydroxylation de la DHK en position 8 par le FMNOOH (B).

L'efficacité de l'hydroxylation de la DHK par l'espèce FMNOOH dépend de la densité de charge négative accumulée sur les carbones 8 et 10. Plus elle est importante, et plus l'attaque nucléophile du carbone sur l'hydroperoxyflavine est favorisée. D'un point de vue chimique, la délocalisation de cette charge dans le cycle adjacent est plus importante pour la DHK_{ox} que pour la DHK_{red}. Ceci est dû à la présence de la fonction céto-énone (schéma 14, rouge) qui, de par sa position et ses propriétés électro-attractrices, permet une meilleure stabilisation de cette charge négative dans le cas de DHK_{ox}. Par conséquent, la forme réduite de la DHK est donc plus nucléophile que sa forme oxydée.

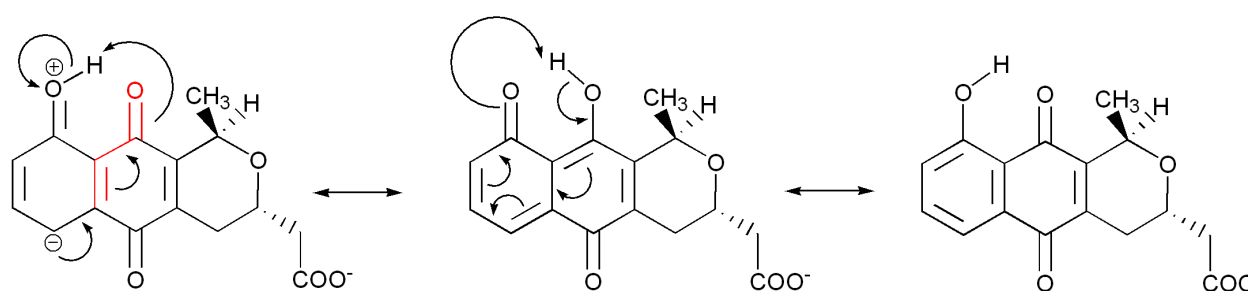


Schéma 14. Formules limites de la DHK_{ox}. La fonction céto-énone est représentée en rouge.

On peut aussi noter que ces deux formes rédox se distinguent également par leurs propriétés acido-basiques. Alors que la forme hydroquinone est capable de faire apparaître deux charges négatives en se déprotonant (schéma 15), la forme quinone, quant à elle, en est incapable. Cette propriété peut rendre l'hydroquinone encore plus nucléophile que la quinone.

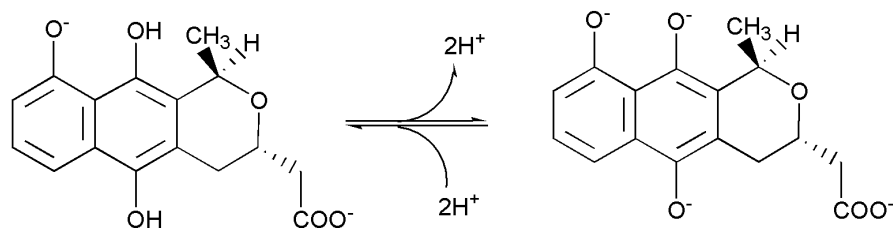


Schéma 15. Equilibre acide base entre les formes protonées et déprotonées de la DHK hydroquinone.

Par conséquent, vis-à-vis de l'hydroperoxyflavine, la forme hydroquinone de la DHK est beaucoup plus réactive que la forme quinone. On peut penser que le pouvoir nucléophile de cette dernière n'est pas assez puissant pour former le produit hydroxylé. Il est donc fort probable que cette différence de réactivité soit à l'origine de la spécificité rédox de ActVA vis-à-vis des trois substrats testés.

Dans le cas des flavoprotéines hydroxylase, il est maintenant bien connu que l'efficacité catalytique de ces enzymes est intimement liée au pouvoir nucléophile de leur substrat (Entsch et coll, 2005). En ce qui concerne la PHBH, la déprotonation du substrat p-OHB au sein du site actif de l'enzyme est nécessaire pour son hydroxylation (Ortiz-Maldonado et coll, 2004). L'apparition d'une charge négative au niveau de la fonction alcool phénolique de ce substrat renforce son pouvoir nucléophile et lui permet de réagir très efficacement avec l'hydroperoxyflavine électrophile. Cette activation du pouvoir nucléophile du substrat par déprotonation semble être primordiale pour la catalyse car la vitesse d'hydroxylation du p-aminobenzoate, un analogue non ionisable du p-OHB, est beaucoup plus lente que celle du p-OHB (Entsch et coll, 1976).

IV.7.C Spécificité structurale de ActVA

La comparaison des rendements obtenus pour les trois substrats (tableau II) indique que la DHK_{red} est hydroxylée plus efficacement que la NNM-A_{red} et la NNM-D_{red}. Ces données sont en accord avec les résultats des expériences illustrées par la figure 36, qui montrent un meilleur rendement d'hydroxylation pour la DHK que pour son énantiomère la NNM-A. Ceci indique que la reconnaissance et/ou l'hydroxylation de ces molécules par ActVA sont dépendantes de la configuration des carbones 3 et 15 situés sur leur cycle pyrane (schéma 6).

Par ailleurs, bien que la NNM-D possède un cycle lactone additionnel par rapport à la NNM-A (schéma 6), les résultats obtenus indiquent qu'à l'état réduit, ces deux molécules sont hydroxylées avec un rendement similaire (tableau II). Ceci peut provenir du fait que la NNM-D_{red} peut être transformée en NNM-A_{red} par voie non enzymatique comme cela a été décrit par Tanaka et collaborateurs (Tanaka et coll, 1982). La préincubation de la NNM-D_{ox} en

présence du système réducteur déazaflavine:EDTA:lumière, peut participer à cette transformation. Par conséquent, la comparaison de ces deux rendements (30 et 22% pour NNM-A_{red} et NNM-D_{red} respectivement) ne semble pas judicieuse car la NNM-D_{red} peut avoir été transformée en NNM-A_{red} dans nos conditions expérimentales. A l'avenir, il sera intéressant de confirmer cela.

Nous pouvons donc conclure que, pour le système ActVA-ActVB, la DHK_{red} est un bien meilleur substrat que la NNM-A_{red} (son énantiomère) et la NNM-D_{red}. Ce résultat est tout à fait en accord avec le fait que les structures de l'actinorhodine et de la DHK possèdent une stéréochimie identique au niveau de leurs carbones 15 et 3 (15 R, 3 S ; schéma 16).

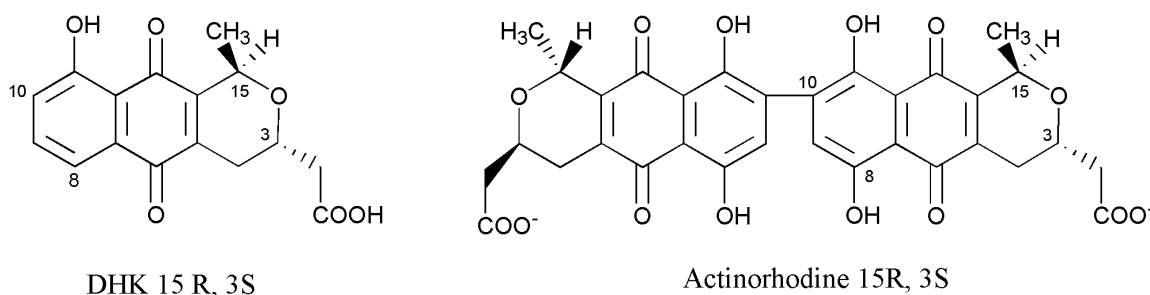


Schéma 16. Structures de la DHK_{ox} et de l'actinorhodine_{ox}.

IV.8 Activité pyronaphthoquinone réductase de ActVB

Nous venons de mettre en évidence que le système ActVA-ActVB est spécifique des pyronaphthoquinones réduites. Ces molécules sont très sensibles à l'oxygène. En présence de 200 μ M d'O₂, elles sont totalement oxydées (figure 30). Bien que la concentration d'oxygène soit sans doute plus faible dans un contexte physiologique, la cellule doit tout de même maintenir une pression réductrice suffisante pour permettre à la DHK d'être hydroxylée puis dimérisée pour former l'actinorhodine. Comment y parvient-elle ?

Nous avons montré récemment que ActVB possédait une activité ferrique réductase capable de catalyser la réduction de complexes ferriques en présence de NADH (article 2) (Filisetti et coll, 2005). Le mécanisme de réduction de ces substrats particuliers par ActVB est différent du mécanisme de type séquentiel ordonné qui a été rapporté pour son activité flavine réductase (cf. introduction). Il implique la présence d'un FMN cofacteur et se déroule selon un mécanisme de type ping-pong (schéma 17). Dans un premier temps, le NADH se fixe au complexe ActVB:FMN et réduit à deux électrons le cofacteur flavinique. Le NAD⁺ formé est ensuite libéré de la forme ActVB:FMN_{red} qui peut alors fixer 2 molécules de complexe ferrique (Fe³⁺). Celles-ci sont réduites par la flavine puis libérées du site actif, régénérant la forme ActVB:FMN_{ox}.

En présence de complexes ferriques, ActVB agit comme une flavoprotéine (nommée ActVB:FMN_c). La flavine qui lui est fortement liée tout au long du cycle sert de relais entre le NADH et le complexe de fer. Cette activité réductase de ActVB:FMN_c est donc totalement différente de l'activité flavine réductase de ActVB qui réduit la flavine libre en présence de NADH sans nécessiter de cofacteur flavinique (Filisetti et coll, 2005).

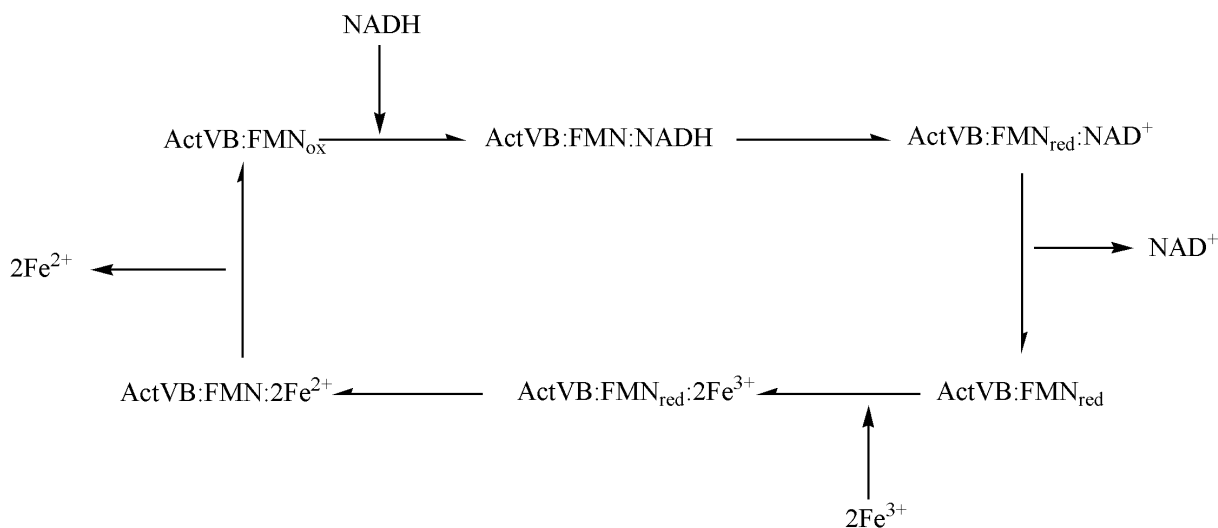


Schéma 17. Mécanisme catalytique de réduction des complexes ferriques par ActVB:FMN_c (Filisetti et coll, 2005).

Nous avons montré que la spécificité de cette activité ferrique réductase est faible (article 2) (Filisetti et coll, 2005). On peut donc penser que ActVB:FMN_c est également capable de réduire des pyronaphthoquinones telles que la NNM-A ou la DHK selon le mécanisme que nous venons de décrire.

Pour tester cette hypothèse, l'activité NNM-A réductase de la forme ActVB:FMN_c a été étudiée. Cette étude a été réalisée en anaérobiose afin d'éviter toute compétition avec l'oxygène. Un mélange contenant 200 μ M de NADH et des quantités croissantes de NNM-A_{ox}, est incubé en anaérobiose. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de ActVB:FMN_c (50 nM final) puis suivie par spectroscopie UV-visible. Notons qu'une telle concentration de FMN (50 nM) est 20 fois inférieure au K_m de l'activité flavine réductase de ActVB pour le FMN_{ox} (Filisetti et coll, 2003). Dans ces conditions, l'activité flavine réductase est donc négligeable.

La figure 41A présente, à titre d'exemple, les spectres UV-visibles enregistrés avant l'ajout de ActVB:FMN_c (○) et en fin de réaction (□) lorsque le mélange contient 136 μ M de NNM-A_{ox}. La disparition totale de la bande d'absorption centrée à 423 nm et l'apparition concomitante d'une nouvelle bande centrée à 353 nm, indiquent que la NNM-A est entièrement réduite en hydroquinone durant cette expérience. ActVB:FMN_c a donc la capacité de catalyser la

réduction de la pyronaphthoquinone NNM-A sans nécessiter la présence de flavine libre supplémentaire.

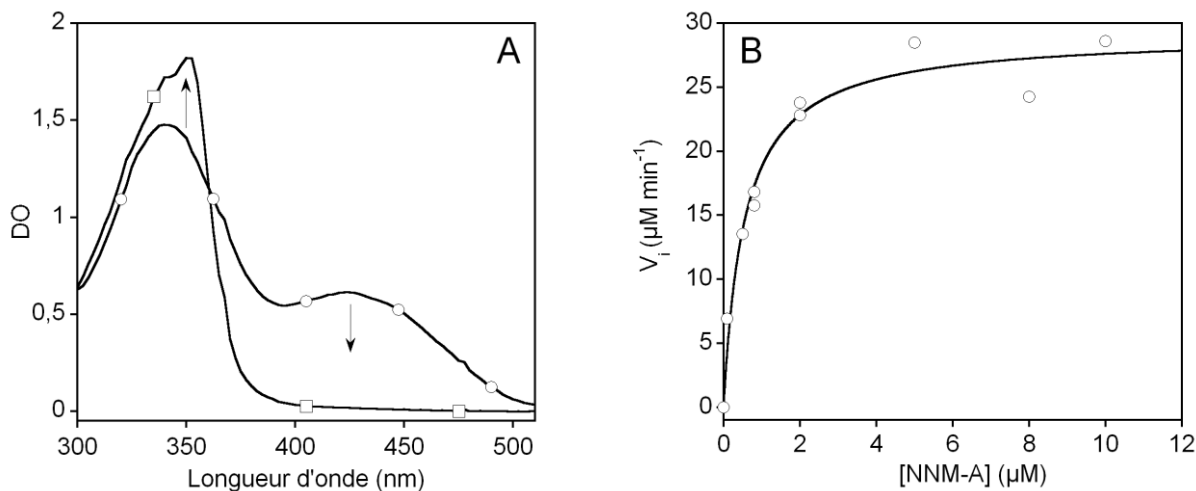


Figure 41. Activité NNM-A réductase de ActVB:FMN_c. Un mélange contenant 200 μM de NADH en solution dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,6, est incubé en anaérobiose ([O₂] < 5 ppm), à 18°C en présence de quantités variables de NNM-A (0 – 575 μM). La réaction est initiée par l'ajout du complexe ActVB:FMN_c (50 nM final). La réduction de la NNM-A est suivie par spectroscopie UV-visible. (A) : spectres UV-visibles du mélange contenant 136 μM de NNM-A avant l'addition du complexe ActVB:FMN_c (○) et en fin de réaction (□). (B) Evolution de la vitesse initiale de réduction de la quinone, observée à 423 nm, en fonction de la concentration de NNM-A. L'ajustement des données est réalisé avec une hyperbole de saturation. Un K_m de 29 ± 6 μM et un k_{cat} de $9,7 \pm 0,4$ μM sont obtenus.

L'activité quinone réductase de ActVB:FMN_c est déterminée en mesurant la diminution d'absorbance à 423 nm au cours du temps. La variation de la vitesse initiale de cette réduction en fonction de la quantité de NNM-A_{ox} décrit une courbe de saturation (figure 41B). Ce phénomène est caractéristique d'un comportement michaelien de ActVB:FMN_c vis-à-vis de la pyronaphthoquinone. La vitesse initiale de réduction de NNM-A est telle que :

$$V_i = \frac{k_{cat} \times [\text{ActVB:FMN}_{c\text{ tot}}] \times [\text{NNM-A}]}{K_m + [\text{NNM-A}]} \quad \text{Equation 18}$$

Avec k_{cat} , la constante de vitesse catalytique (correspond au nombre de cycles catalytiques effectués par ActVB:FMN_c en une seconde) et K_m , la constante de Michaelis.

L'ajustement des données expérimentales par l'équation 18, nous permet de déterminer les paramètres cinétiques de cette réduction : $k_{cat} = 9,7 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ et $K_m = 29 \pm 6 \text{ μM}$. Ces résultats indiquent que ActVB:FMN_c est capable de catalyser la réduction de la NNM-A_{ox} par le NADH via son cofacteur FMN. Dans un contexte physiologique, cette enzyme aurait donc un double rôle. Le premier serait de fournir à son partenaire ActVA, le FMN_{red} nécessaire à l'activation de l'oxygène sous forme de FMNOOH. Le second consisterait à activer le

substrat pyronaphthoquinonique (la DHK) par réduction, afin qu'il puisse être hydroxylé efficacement au sein de ActVA.

IV.9 Conclusion

Il avait été proposé depuis longtemps que le système ActVA-ActVB intervenait dans la dernière étape de biosynthèse de l'actinorhodine. Nous avons été en mesure de tester cette hypothèse en étudiant l'activité de ce système en présence du précurseur de l'actinorhodine, la DHK, ainsi que deux analogues structuraux, la NNM-A (son énantiomère) et la NMM-D, l'analogue lactonique de la NNM-A.

Nos résultats montrent clairement que le système ActVA-ActVB est capable de catalyser *in vitro* l'hydroxylation de la DHK par l'oxygène moléculaire. En revanche, la dimérisation de la DHK n'a pas été observée dans nos conditions expérimentales et il se peut qu'une activité supplémentaire du type dimérase soit nécessaire pour catalyser la formation de l'actinorhodine au sein de *Streptomyces coelicolor*.

Le produit de la réaction, nommé DHK-OH, a été identifié par spectrométrie de masse et caractérisé par spectroscopie UV-visible. La position de l'hydroxylation n'a pas été déterminée, cependant, les similarités observées entre le spectre UV-visible de la DHK-OH et celui de la 5,8 dihydroxy-1,4-naphthoquinone, un analogue de la DHK hydroxylé en para de sa fonction alcool phénolique, semblent indiquer que cette hydroxylation s'effectue au niveau du noyau phénol de la DHK.

Le fonctionnement du système ActVA-ActVB a été étudié à l'état stationnaire en présence de la forme quinone de la DHK (DHK_{ox}). Les faibles rendements d'hydroxylation que nous avons obtenus (8 %) nous ont amené à penser que dans nos conditions expérimentales, l'activité réductase de ActVB et l'activité monooxygénase de ActVA n'étaient pas couplées de manière optimale. Une analyse approfondie des différentes réactions de découplage possibles, nous a permis de mettre en évidence la cause principale de ce faible rendement : la forme quinone de la DHK n'est pas substrat et elle doit être préalablement réduite en hydroquinone pour être hydroxylée au sein du site actif de ActVA.

Ceci a été clairement confirmé en déterminant et en comparant les rendements d'hydroxylation de la DHK quinone et hydroquinone obtenus avec le système d'hydroxylation ActVA:FMNH₂:O₂. Nos résultats montrent en effet que l'activité

hydroxylase de ActVA est strictement spécifique de la forme hydroquinone de la DHK car aucune hydroxylation n'est observée en présence de sa forme quinone.

Suite à ces résultats, un mécanisme réactionnel d'hydroxylation a été proposé. Au sein du site actif de ActVA, la DHK réagit en tant que nucléophile avec le groupement peroxo électrophile du FMNOOH pour former la DHK-OH et le FMN_{ox}. Cette attaque nucléophile est vraisemblablement réalisée par le C8 ou le C10 de la DHK car ces deux positions sont particulièrement électronégatives. En accord avec la spécificité rédox de ActVA, les charges négatives partielles situées sur ces deux positions sont beaucoup plus importantes dans la forme hydroquinone que dans la forme quinone de la DHK. La DHK_{red}, bien plus nucléophile que la DHK_{ox}, réagit donc plus efficacement avec le FMNOOH pour former le produit hydroxylé.

Nous avons montré que ActVB était capable de catalyser très efficacement la réduction de la DHK via une activité pyronaphthoquinone réductase originale impliquant une flavine cofacteur. Cependant, il est fort probable que les conditions réductrices du cytosol de *Streptomyces coelicolor* soient suffisantes pour maintenir la DHK sous sa forme hydroquinone.

Finalement, le système ActVA-ActVB ne semble pas être strictement spécifique de son substrat naturel la DHK_{red}. Il est en effet capable de catalyser l'hydroxylation de son énantiomère, la NNM-A_{red}, et de deux analogues structuraux, la NNM-D_{red} et la DHAQ. Néanmoins, la DHK_{red} reste tout de même le substrat préférentiel du système. L'efficacité catalytique du système ActVA-ActVB est donc dépendante de la nature et la configuration des différents substituants du cycle pyrane contenu par ces molécules.

Conclusions générales

Chez la plupart des organismes aérophiles, les réactions d'hydroxylation occupent un rôle central dans la biosynthèse d'une multitude de molécules organiques comme certains antibiotiques, neurotransmetteurs, hormones ou encore certains acides aminés. Elles sont également impliquées chez les microorganismes dans le catabolisme de diverses molécules telles que les alcanes et certains composés aromatiques toxiques comme le styrène, le phénol et le dibenzothiophène. Devant les intérêts biotechnologiques et fondamentaux que représentent ces réactions, des efforts de recherche importants ont été réalisés depuis plusieurs décennies pour comprendre leurs mécanismes, aussi bien d'un point de vue cellulaire que moléculaire. Au cours de ces réactions, l'oxygène, faiblement réactif dans son état fondamental, doit être activé par voie enzymatique pour être efficacement incorporé au sein du substrat. D'un point de vue général, ces catalyseurs biologiques possèdent tous un point commun : ils permettent l'activation de l'oxygène par réduction.

Dans le cas particulier des enzymes à cofacteurs flaviniques telles que les flavoprotéines hydroxylases, l'oxygène est activé sous forme de peroxo O_2^{2-} au sein d'une espèce hydroperoxyflavine. Le mécanisme catalytique de ces flavoprotéines a pendant longtemps été considéré comme un modèle pour décrire la manière dont la flavine intervient dans les réactions d'hydroxylation. Cependant, depuis une dizaine d'années, un nouveau type d'hydroxylases flavine-dépendantes a été identifié chez certains microorganismes. A la différence des flavoprotéines hydroxylases, ces systèmes sont composés de deux enzymes distinctes, une flavine réductase et une monooxygénase flavine-dépendante. Cette monooxygénase n'est pas une flavoprotéine et son activité hydroxylase est dépendante de la présence d'une flavine libre réduite, fournie via l'activité flavine réductase de son partenaire.

Au début de notre projet, le mécanisme enzymatique de ces systèmes à deux composants était encore inconnu et leurs différences vis-à-vis des flavoprotéines hydroxylases soulevaient de multiples questions :

- Comment s'effectue le transfert de flavine entre la flavine réductase et la monooxygénase ? Un complexe entre les deux protéines est-il nécessaire à ce transfert, ou la flavine diffuse-t-elle passivement d'une protéine à l'autre ?

- Comment l'oxygène est-il activé et quel est le rôle précis des deux enzymes dans cette étape ?
- Comment se coordonnent les activités flavine réductase et monooxygénase et comment sont-elles régulées ?

Le but de mon travail de thèse a été de répondre à ces trois questions. Pour cela, le fonctionnement de l'hydroxylase flavine-dépendante à deux composants ActVA-ActVB impliqué dans la biosynthèse de l'actinorhodine, un antibiotique naturel synthétisé par *Streptomyces coelicolor*, a été caractérisé d'un point de vue cinétique et thermodynamique. Les données quantitatives obtenues grâce à ces deux approches complémentaires nous permettent aujourd'hui de fournir des éléments de réponse à ces trois interrogations.

La flavine : une navette rédox qui va et vient selon son bagage électronique...

Au début de notre projet, l'hypothèse d'un transfert de flavine par diffusion passive avait été avancée pour différentes hydroxylases à deux composants, mais aucune donnée précise ne permettait à l'époque de confirmer cela. Il nous a donc semblé essentiel de déterminer précisément l'affinité de la flavine oxydée et réduite pour les deux enzymes.

Nos résultats montrent clairement qu'à l'état réduit, la flavine est bien plus affine pour la monooxygénase ActVA que pour la réductase ActVB alors qu'à l'état oxydé, elle possède une meilleure affinité pour la réductase que pour la monooxygénase. Au cours du cycle catalytique, cette différence d'affinité permet d'orienter le transfert de flavine d'une protéine à l'autre sans nécessiter d'interaction entre les deux protéines. De plus, durant son transfert, la flavine libre réduite n'a pas le temps d'être réoxydée par l'oxygène moléculaire, ce qui indique que la cinétique de ce phénomène est très rapide.

Un mécanisme d'activation de l'oxygène original.

Des études de cinétique enzymatique, ont permis de mettre en évidence une activation de l'oxygène par la formation d'un intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine au sein de la monooxygénase ActVA. Nos données montrent que la formation de cette espèce ne nécessite pas la présence de la réductase qui sert uniquement de générateur de flavine réduite.

Contrairement aux flavoprotéines hydroxylases, cette espèce intermédiaire est fortement stabilisée au sein du site actif de la monooxygénase. De plus, sa formation ne nécessite pas la présence du substrat à hydroxyler. Ces deux propriétés originales semblent être communes à la plupart des systèmes d'hydroxylation flavine-dépendants à deux composants actuellement connus.

Régulation de l'activité hydroxylase flavine-dépendante à deux composants.

Il semble que le mécanisme de régulation des hydroxylases à deux composants soit fondamentalement différent de celui des flavoprotéines hydroxylases. Toutefois ces deux systèmes ont un point commun : ils parviennent à réguler finement l'étape de réduction de la flavine par le NADH de manière à économiser les équivalents réducteurs (NAD(P)H) de la cellule.

Dans le cas des flavoprotéines hydroxylases, le substrat régule de façon directe l'activité flavine réductase. Son interaction avec l'enzyme provoque un changement de conformation du site actif qui stimule fortement l'étape de réduction de la flavine cofacteur par le NADH. En l'absence de substrat, la flavine n'est pas réduite et la fonction hydroxylase de l'enzyme est complètement inactivée.

L'activité des hydroxylases à deux composants semble être régulée d'une façon totalement différente. Dans un contexte physiologique, en absence de substrat, la flavine libre intracellulaire est complexée à la monooxygénase sous forme d'hydroperoxyflavine. La quantité de flavine libre disponible pour la réductase étant faible, l'activité de cette dernière est fortement réduite et le NADH n'est plus oxydé. Lorsque le substrat est présent, l'hydroperoxyflavine est instantanément consommé pour former le produit et la flavine oxydée est libérée du site actif de la monooxygénase. Ainsi, la flavine redevient disponible pour la réductase qui peut à nouveau fonctionner de concert avec son partenaire la monooxygénase. Cette stabilisation de l'hydroperoxyflavine par la monooxygénase en

absence de substrat, régule ainsi l'activité flavine réductase et évite une oxydation inutile du NADH.

Le système ActVA-ActVB : une hydroxylase flavine-dépendante impliquée dans l'avant dernière étape de biosynthèse de l'actinorhodine.

Historiquement, il avait été proposé que le système ActVA-ActVB soit une enzyme bifonctionnelle capable d'hydroxyler et de dimériser la DHK pour former l'actinorhodine. Cependant, jusqu'à présent, aucune donnée biochimique n'avait pu confirmer cette idée.

Pour la première fois, nous avons été en mesure de tester cette hypothèse en étudiant l'activité du système ActVA-ActVB en présence de son substrat naturel, la DHK. Nos résultats montrent clairement que cette enzyme est capable de catalyser l'hydroxylation de la DHK. Toutefois, il semble qu'elle ne soit pas en mesure de dimériser le produit hydroxylé pour former l'actinorhodine. La dernière étape de cette biosynthèse reste par conséquent inconnue.

Nos résultats montrent d'autre part que cette réaction d'hydroxylation se réalise vraisemblablement via une attaque nucléophile de l'espèce électrophile C(4a)-hydroperoxyflavine par les carbones 8 ou 10 de la DHK. En accord avec ce mécanisme, il apparaît que l'efficacité catalytique du système ActVA-ActVB est intimement liée au pouvoir nucléophile du substrat, car seule la forme réduite à deux électrons de la DHK (hydroquinone) est capable d'être hydroxylée. Le pouvoir nucléophile du substrat est également important dans les réactions catalysées par les flavoprotéines hydroxylases. Cette caractéristique n'est donc pas spécifique des hydroxylases flavine-dépendantes à deux composants.

Enfin le système ActVA-ActVB n'est pas strictement spécifique de la DHK. Il peut également catalyser l'hydroxylation de son énantiomère la NNM-A et de l'analogue lactonique de cette dernière, la NNM-D. Cette large spécificité de substrat est en accord avec le fait que les enzymes intervenant dans les étapes de « tailoring » (finition) des antibiotiques chez *Streptomyces* peuvent intervenir dans différentes voies de biosynthèse.

Perspectives

- Etude des différentes étapes du cycle catalytique par cinétique rapide

Les différentes expériences que nous avons effectuées nous ont permis de définir le mécanisme global du système ActVA-ActVB. Toutefois, les paramètres cinétiques des différentes étapes rapides de son cycle catalytique (transfert de flavine, formation de l'intermédiaire C(4a)-hydroperoxyflavine et hydroxylation de la DHK_{red}) n'ont pas été déterminés dans le cadre de ce travail. Il sera donc intéressant d'étudier ces étapes par cinétique rapide.

Ces différentes données cinétiques pourront être comparées à celles qui ont été récemment obtenues pour le système HpaB-HpaC (Sucharitakul et coll, 2005; Sucharitakul et coll, 2005) afin d'identifier les caractéristiques communes des hydroxylases flavine-dépendantes et d'avoir une vision plus globale du fonctionnement de ces enzymes originales.

- Identification de la dimérase nécessaire à la formation de l'actinorhodine

Récemment, une nouvelle activité dimérase a été identifiée chez *Streptomyces coelicolor*. Cette métalloenzyme de type cytochrome P450 nommée *CYTP 158A2* est capable, en présence du système réducteur FNR/Fdl, de catalyser la dimérisation de la flavioline, une naphthoquinone analogue à la DHK-OH, dépourvue de cycle pyrane (schéma 18). La structure tridimensionnelle de cette enzyme en complexe avec deux molécules de flavioline a également été résolue (Zhao et coll, 2005).

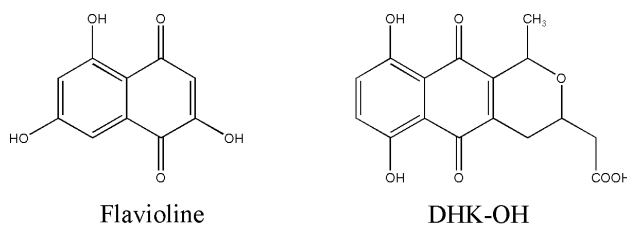


Schéma 18. Structures de la flavioline et de la DHK hydroxylée en position 8.

Le volume important de la poche catalytique de cette enzyme pourrait lui permettre de catalyser le couplage de substrats plus volumineux. Ce système est d'ailleurs peu spécifique car il est capable de catalyser la trimérisation de la flavioline. Il semble donc intéressant de tester l'activité de cette dimérase vis-à-vis de la DHK-OH mais également de la DHK.

- Détermination de la structure tridimensionnelle de ActVA

Les monooxygénases des systèmes d'hydroxylation à deux composants sont, d'un point de vue structural, encore très peu connues. Jusqu'à présent, une seule structure

cristallographique a été rapportée pour la monooxygénase SsuD du couple SsuD-SsuE intervenant dans l'hydroxylation d'un alcane sulfonate chez *Escherichia coli*. Comme nous l'avons décrit en introduction, les différentes monooxygénases de la famille TC-FDM ne sont pas homologues entre elles. La structure de SsuD ne peut donc pas être utilisée pour comprendre le mécanisme réactionnel du système ActVA-ActVB. Il semble donc intéressant de déterminer également la structure de ActVA en présence et en absence de ces différents substrats. Cette étude devrait permettre de mieux comprendre les différentes propriétés de ActVA que nous avons mises en évidence durant ce travail. Elle permettra notamment de localiser le ou les site(s) actif(s) dans le dimère et d'identifier les déterminants structuraux qui permettent à ActVA de stabiliser l'hydroperoxyflavine.

I Matériel biologique

I.1 Souches bactériennes

Escherichia coli DH5 α : cette souche possède le génotype F Φ 80lacZ Δ M15 *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* ($r_K^- m_K^+$)*supE44 relA1 deoR* Δ (lacZYA-*argF*) U169 *phoA*. Elle est utilisée en biologie moléculaire afin d'amplifier les plasmides contenant les gènes *actVA* et *actVB*.

Escherichia coli BL21 (DE3) avec ou sans pLysS : cette souche possède le phénotype F Φ *ompT hsdS_B*($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R). Elle permet la surexpression des protéines recombinantes dont le gène est sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. L'expression des gènes est inductible par la présence de l'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG). Cette souche peut aussi comporter le plasmide pLysS qui code pour le lysozyme du bactériophage T7. L'expression de cette protéine possède deux fonctions : la première est d'inhiber l'expression des gènes placés sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 en absence d'IPTG. La seconde est de favoriser la lyse cellulaire lors des cycles congélation décongélation.

Escherichia coli B834 (DE3) pLysS : cette souche est un dérivé auxotrophe pour la méthionine de la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. Elle a été utilisée pour la surexpression de la protéine ActVB His-tag.

I.2 Vecteurs plasmidiques

I.2.A Le vecteur pT7-7

Ce vecteur contient le gène *bla* codant pour une protéine de résistance à l'ampicilline (la β -lactamase), le promoteur p_{T7} de l'ARN polymérase du bactériophage T7 en aval duquel se trouve un site de clonage multiple renfermant 9 sites de restriction (Tabor et coll, 1985).

I.2.B Le vecteur pActVB His-tag

Ce plasmide provient du vecteur pT7-7 dans lequel a été cloné le gène codant pour ActVB, fusionné à une étiquette hexa-histidine (His-tag) au niveau de son extrémité C-terminale. Les sites de restriction *NdeI* et *BamHI* du site de clonage multiple ont été employés pour cette étape d'insertion (Filisetti, 2004).

I.2.C Le vecteur pActVA-ORF5

Ce plasmide provient lui aussi du vecteur pT7-7 dans lequel a été inséré le gène codant pour la protéine ActVA-ORF5. Cette insertion a été effectuée au niveau des sites *NdeI* et *BamHI* situés dans le site de clonage multiple du pT7-7 (Filisetti, 2004).

I.3 Milieu de culture

Pour les cultures de bactéries, le milieu LB Broth Miller (Euromedex) a été utilisé. Toutes les étapes de culture sont réalisées en présence des antibiotiques de sélection préparés et utilisés extemporanément en quantité préconisée (Sambrook et coll, 1989).

II Méthodes de biologie moléculaire

II.1 Purification de l'ADN plasmidique

Cette étape est réalisée à partir d'une culture de cellules DH5 α préalablement transformées par le plasmide à purifier. Classiquement, 100 mL de milieu LB sont ensemencés avec une colonie et incubés pendant une nuit à 37°C sous agitation (220 rpm). L'extraction de l'ADN s'effectue à l'aide du kit FlexiPrep (Pharmacia Biotech). Cette méthode permet de libérer les acides nucléiques des cellules par lyse alcaline, dégrader les ARN à l'aide d'un traitement à la RNase et enfin d'éliminer les acides nucléiques chromosomiques en les précipitant à l'aide d'une solution d'isopropanol. L'ADN plasmidique est récupéré en utilisant du SephaglassTM FP, une matrice de silice en suspension dans une solution de chlorure de guanidinium. En plus de favoriser la fixation sélective de l'ADN sur les billes de silice, ces sels chaotropiques entraînent la précipitation des protéines. L'ADN plasmidique pur est finalement élué par une solution de faible force ionique.

La concentration d'ADN plasmidique est estimée par spectroscopie UV-visible, sachant que 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 μ g/mL d'ADN circulaire double brin.

II.2 Digestion et analyse de l'ADN plasmidique

De manière générale, 0,2 à 3 μ g d'ADN circulaire sont digérés pendant 90 min à 37°C par 5 U d'enzyme de restriction dans le tampon approprié et dans un volume final de 100 μ L.

Les fragments plasmidiques issus de la digestion sont analysés sur gel d'agarose 2 %. Un volume de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 % et glycérol

30 %) est ajouté à 5 volumes de solution d'ADN et déposé sur gel. La migration s'effectue sous une tension de 70 V dans du tampon TAE (5 %) contenant 5 µg/mL de bromure d'éthidium (BET). La fluorescence du BET intercalé entre les bases d'ADN (observée en l'excitant par une lumière UV) permet de déterminer la taille et la quantité des fragments obtenus.

II.3 Préparation de cellules compétentes

Les bactéries sont cultivées dans 10 mL de milieu LB jusqu'en phase exponentielle de croissance (absorbance à 600 nm = 0,5). Elles sont récupérées par centrifugation et resuspendues délicatement à 4°C dans 5 mL de CaCl₂ 0,1 M stérile puis incubées 30 min dans la glace. Ce traitement altère les structures membranaires en créant des microperforations dans la bicouche lipidique et facilite la pénétration d'ADN exogène dans les cellules.

II.4 Transformation des cellules compétentes

200 µL de cellules compétentes sont incubées dans la glace en présence de 20 à 100 ng de plasmide pendant 30 min. Un choc thermique est réalisé en chauffant le mélange à 42°C pendant 45 s. Ce traitement thermique accentue la déstabilisation de la bicouche lipidique membranaire et stimule la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Après 2 min d'incubation dans la glace, 800 µL de LB préchauffé à 37°C sont ajoutés et l'ensemble est incubé pendant 90 min à 37°C sous agitation (220 rpm). Les cellules sont ensuite étalées sur des boîtes de Pétri LB-Agar contenant l'antibiotique adéquat pour sélectionner les transformants. Ces boîtes sont enfin incubées dans une étuve thermostatée à 37°C pendant une nuit.

III Méthodes de biochimie

III.1 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par spectroscopie d'absorption UV-visible à 595 nm selon la méthode décrite par Bradford (Bradford, 1976) grâce à une gamme étalon réalisée à partir d'albumine de sérum de bœuf.

III.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les échantillons protéiques (0,5 à 15 µg) sont dénaturés par chauffage 5 min à 95°C dans un volume identique de tampon de dénaturation 2X (Tris-HCl 1 M pH 6,8, SDS 10 %, glycérol 15 %, BBP 2 %, β-mercaptoéthanol 2 %). Les fractions sont ensuite déposées sur un gel de polyacrylamide 12 % contenant du SDS (Laemmli et coll, 1973). Les polypeptides chargés négativement par le SDS sont séparés selon leur masse moléculaire grâce à un courant électrique de 150 V et 30 mA appliqué au gel pendant 90 min. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bleu de Coomassie (~ 30 min) puis décoloré dans une solution d'acide acétique/méthanol (1 nuit).

En ce qui concerne l'analyse des protéines cellulaires totales, 1 mL de culture est prélevé et centrifugé à 13000 rpm pendant 30 s. Le culot est repris dans 100 µL d'eau distillée et 100 µL de tampon de dénaturation 2X. 5 à 10 µL de ce mélange sont déposés sur gel et les protéines sont séparés selon le protocole décrit ci-dessus.

Pour les analyses de surexpression, il est nécessaire de comparer l'évolution de la quantité de protéine recombinante produite au cours de la culture. Le volume de mélange à déposer sur gel est donc ajusté en fonction de la DO à 600 nm afin de déposer dans chaque puit une quantité équivalente de protéines totales.

III.3 Surexpression et purification de ActVA et ActVB His-tag

III.3.A Surexpression de ActVA

La souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS est transformée par le plasmide pActVA-Orf5. Les cellules transformées sont sélectionnées sur milieu solide LB-Agar contenant 200 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol. 100 mL de LB liquide complétés par les mêmes antibiotiques sont inoculés par un de ces transformants puis incubés à 37°C sous agitation (220 rpm) pendant une nuit. Le matin, les cellules en phase stationnaire de croissance sont inoculées à 1 % dans 10 L de milieu LB puis placées à 37°C sous agitation. Lorsque la DO_{600 nm} atteint 0,4, la surproduction de ActVA est induite par l'ajout de 0,4 mM d'IPTG. Après 5 à 6 heures de culture à 37°C à 220 rpm, les cellules sont récoltées par centrifugation (8000 rpm, 4°C pendant 8 min) puis resuspendues dans 100 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 10 % de glycérol et stockées à -80 °C. Il faut noter que la préculture nécessaire à la surexpression peut tout aussi bien être réalisée directement à partir d'un stock

glycérol de cellules BL21 (*DE3*) pLysS contenant pActVA-Orf5 congelées en phase exponentielle avant l'induction.

III.3.B Surexpression de ActVB His-tag

La souche *Escherichia coli* B834 (*DE3*) pLysS est transformée par le plasmide pActVB His-tag. De la même manière que pour la protéine ActVA, les transformants sont sélectionnés sur milieu LB-Agar contenant 200 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol. 100 mL de LB liquide complétés par les mêmes antibiotiques sont inoculés par un de ces transformants puis incubés à 37°C sous agitation pendant une nuit. 10 L de milieu LB sont inoculés à 1 % avec cette préculture, puis placés à 37°C sous agitation. Ces cellules sont ensuite utilisées pour. Lorsque la $DO_{600\text{ nm}}$ atteint 0,3, la surexpression de ActVB His-tag est induite par l'ajout de 250 µM d'IPTG. La température de la culture est alors abaissée à 25°C afin de minimiser la formation de corps d'inclusion. Après 6 heures de culture, les cellules sont récoltées par centrifugation (8000 rpm, 4°C pendant 8 min) puis resuspendues dans 100 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contenant 10 % de glycérol et préalablement refroidi à 4°C. Comme ActVB est sensible à la protéolyse, 1 tablette d'antiprotéases Complete EDTA freeTM (Roche) est systématiquement ajoutée pour 50 mL de suspension cellulaire. Cette dernière est ensuite congelée à - 80°C.

III.3.C Préparation des extraits protéiques solubles

L'extraction des protéines cellulaires totales est réalisée à l'aide d'une presse de FRENCH. Dans un premier temps, les cellules sont très fortement comprimées dans une chambre hermétique et sont ensuite libérées au travers d'un orifice de faible diamètre. Cette dernière étape entraîne une variation de pression violente qui permet de lyser très efficacement les cellules. La suspension bactérienne est décongelée puis chargée dans la chambre de compression (35 mL). Une pression de 16000 psi est appliquée à l'aide d'un vérin hydraulique. Les cellules sont ensuite lysées et récupérées à température ambiante. Les débris cellulaires sont éliminés par ultracentrifugation à 45000 rpm pendant 90 min à 4°C. Le surnageant correspondant aux extraits protéiques solubles est prélevé et stocké à 4°C.

III.3.D Purification de ActVA

Toutes les étapes de purification sont réalisées en chambre froide à 4°C avec un système de chromatographie de type FPLC Biologic HR (Bio-Rad).

III.3.D.a Colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose XL

Les extraits protéiques solubles (~300 mg de protéines) sont chargés à 1 mL/min sur une colonne contenant 20 mL de Q-Sepharose XL (Amersham Biosciences) préalablement équilibrée en tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6, 10 % glycérol (tampon A). La colonne est ensuite lavée avec 60 mL de tampon A contenant 25 mM de NaCl à 1,2 mL/min. Les protéines sont ensuite éluées par un gradient linéaire allant de 25 à 500 mM de NaCl sur 400 mL à 1,2 mL/min. Les fractions contenant ActVA, éluées par 300 mM de NaCl (~ 60 mL). Ces fractions sont ensuite rassemblées et concentrées jusqu'à 2 mL à l'aide d'une unité d'ultrafiltration rapide (Amicon ultra 15 YMPD 10K, Millipore) constituée de membranes de cellulose régénérée. Durant cette étape, environ 30 % de la quantité totale de ActVA peut être perdue. Ceci est probablement dû à la formation d'un gradient de concentration de ActVA au sein de ces unités. A forte concentration et en présence de sels, cette protéine semble s'adsorber irréversiblement sur ces membranes. Pour diminuer ce phénomène, il suffit de remettre en suspension régulièrement la solution protéique lors de la concentration, afin de réduire la formation de ce gradient de concentration. D'autre part, l'élimination du NaCl des concentrats par 3 cycles de dilution/concentration avec le tampon A limite ce phénomène d'adsorption.

III.3.D.b Colonne de tamisage moléculaire Superdex 200

La solution protéique concentrée (~10 mg/mL) est chargée sur une colonne Superdex 200, 16/60 (Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec du tampon A. La séparation des protéines est réalisée à l'aide du même tampon et les fractions contenant ActVA sont récoltées, rassemblées puis concentrées par ultrafiltration (Amicon ultra 4 YMPD 10K, Millipore) pour atteindre une concentration allant de 14 à 30 mg/mL selon les préparations. Ces solutions contenant ActVA pure à environ 95 % sont ensuite aliquotées en volumes de 50 µL et stockées à - 80°C.

III.3.E Purification de ActVB His-tag**III.3.E.a Colonne d'affinité Nickel-NTA**

Les extraits solubles (~300 mg de protéines) préparés selon la méthode décrite ci-dessus sont chargés à 1 mL/min sur une colonne d'affinité Nickel-NTA (Qiagen) de 25 mL préalablement équilibrée en tampon A. La colonne est ensuite lavée à 1 mL/min par 250 mL du même tampon contenant 10 mM d'imidazole, puis par un même volume de tampon contenant 50

mM d'imidazole. Les fractions contenant ActVB His-tag sont ensuite éluées à 1 mL/min par 125 mM d'imidazole (~ 60 mL) rassemblées et directement chargées sur une colonne échangeuse d'anions UNO Q (Bio-Rad). Cette étape permet d'éliminer l'imidazole en présence duquel ActVB His-tag est instable et de concentrer la protéine.

III.3.E.b Colonne échangeuse d'anions UNO-Q

Les fractions contenant ActVB His-tag provenant de la première étape de purification sont chargées à 1 mL/min sur une colonne échangeuse d'anions UNO-Q (Bio-Rad) de 6 mL préalablement équilibrée en tampon A. Un lavage de 60 mL de tampon A est réalisé à 1 mL/min pour éliminer toute trace d'imidazole, puis ActVB His-tag est éluée avec 100 mM de NaCl. Les fractions sont ensuite rassemblées, aliquotées en volumes de 50 µL et enfin stockées à - 80°C.

III.3.F Préparation de apo ActVB His-tag

2 mg de ActVB His-tag purifiés selon le protocole décrit ci-dessus sont chargés sur une colonne d'affinité Nickel-NTA (Qiagen) de 1 mL préalablement équilibrée en Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 10 % glycérol (tampon B). Le cofacteur FMN est alors extrait de ActVB His-tag par 1,5 mL d'une solution acide dénaturante contenant 2 M de KBr et 2 M d'urée. Ce traitement est suivi d'un lavage par 4 mL de tampon B afin d'éliminer la solution de dénaturation et de renaturer l'apo ActVB His-tag. L'apoprotéine est enfin éluée par 5 mL de tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,6, contenant 250 mM d'EDTA et récoltée en fraction de 1 mL. La majeure partie du nickel est éluée dans les deux premières fractions, alors que l'apo ActVB His-tag est présente dans les 3 dernières à raison de 300 à 600 µg/mL. Ces trois fractions sont rassemblées et directement utilisées pour les expériences de fixation à l'équilibre. Le rendement de cette étape est d'environ 40 %.

IV Méthodes de biophysique

IV.1 Spectroscopie d'absorption UV-visible

Si l'on considère une molécule diatomique simple, l'absorption d'un photon d'une énergie appropriée $E = h\nu$ (où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon), permet à cette molécule d'effectuer une transition d'un niveau électronique fondamental S_0 à un niveau excité S_1 . Chacun de ces niveaux sont caractérisés par une fonction $E(r)$ qui représente l'énergie du système en fonction de la distance r séparant les deux atomes qui constituent

cette molécule (figure 1). Les mouvements de vibration qui animent ces atomes font apparaître de très nombreux sous-états énergétiques supplémentaires nommés niveaux d'énergie vibrationnels (lignes horizontales sur la figure 1 indexées respectivement par a_1 , a_2 et a_3). Pour des molécules plus complexes, des mouvements de rotation s'y ajoutent et font apparaître des niveaux d'énergie rotationnels. Il en résulte que chaque niveau électronique est peuplé d'un quasi-continuum de niveaux d'énergie. A température ambiante, la plupart des molécules se trouvent à l'état S_0 . L'énergie du photon nécessaire à faire passer la molécule d'un état électronique fondamental à un état excité n'est donc pas nécessairement égale à ΔE_1 ($S_1, a_1 - S_0, a_1$) mais peut être aussi égale à ΔE_2 ($S_1, a_2 - S_0, a_1$) ou encore à ΔE_3 ($S_1, a_3 - S_0, a_1$) comme le représentent les flèches sur la figure 1.

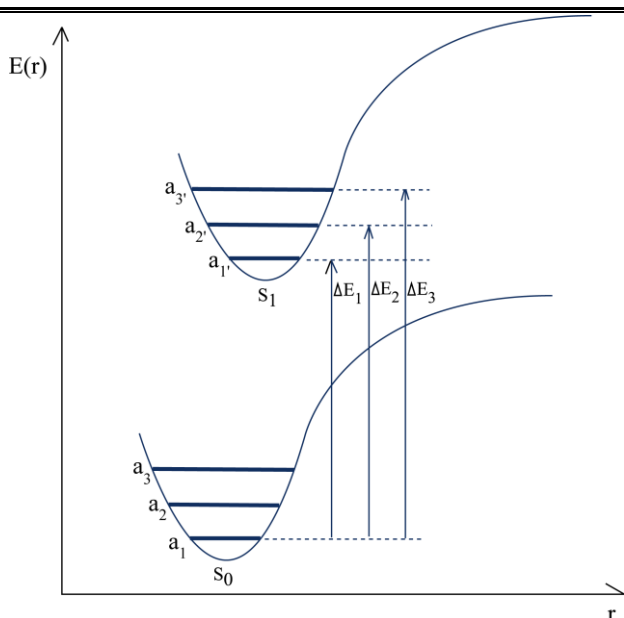


Figure 1. Niveaux d'énergie d'une molécule diatomique et transitions électroniques induites par l'absorption de photons d'énergies différentes.

Ainsi, les spectres moléculaires sont composés de bandes d'absorption dont chacune représente une transition électronique et à l'intérieur desquelles se trouvent les pics correspondant aux différents niveaux vibrationnels et rotationnels. Chaque bande d'absorption est caractérisée par deux paramètres :

- la longueur d'onde de son maximum d'absorption nommée λ_{\max} (nm)
- son intensité ou densité optique (DO) maximale. Elle est déterminée par la valeur du coefficient d'extinction molaire du chromophore à une longueur d'onde (ϵ_λ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Ces deux grandeurs sont liées à la concentration de l'échantillon par la loi de Beer Lambert qui s'exprime selon l'équation suivante :

$$DO_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

où DO_{λ} est la densité optique de l'échantillon à une longueur d'onde λ , l la longueur du trajet optique du faisceau lumineux (cm) et c la concentration (M). Les molécules biologiques possédant des systèmes de doubles liaisons délocalisées telles que le tryptophane ou encore la flavine mononucléotide (FMN), ont des ΔE ($S_1 - S_0$) correspondant à une gamme de longueurs d'onde qui s'étend de l'ultraviolet au visible. On les appelle des chromophores. La spectroscopie UV-visible est donc une technique très utile pour étudier ces systèmes.

IV.2 Fluorescence

Comme nous venons de le voir plus haut, en absorbant un photon, un chromophore passe d'un état électronique fondamental à un état excité qui est instable à température ambiante. Le retour à l'état fondamental S_0 peut se faire par échange thermique avec l'environnement. L'excès d'énergie se dissipe alors sous forme de chaleur. C'est ce qu'il se passe en spectroscopie d'absorption classique. Il se peut aussi que la molécule revienne à S_0 en émettant un photon : c'est le phénomène de fluorescence. La fluorescence s'observe dans un spectrofluorimètre. L'échantillon est éclairé par une lumière monochromatique de longueur d'onde λ_{exc} et l'intensité du signal de fluorescence est récupérée à 90° du signal émis. On enregistre un spectre de fluorescence en mesurant l'intensité de fluorescence émise dans une gamme de longueurs d'onde (λ_{em}) donnée. Ce spectre peut être caractérisé par deux paramètres :

- son intensité : I_F .

Elle dépend du rendement quantique Φ du chromophore tel que $\Phi = \text{nbr de photons émis} / \text{nbr de photons absorbés}$, et aussi de l'intensité de la lumière d'excitation I_0 telle que

$$IF = \Phi I_0$$

- sa longueur d'onde maximale d'émission : $\lambda_{em \text{ max}}$.

Elle dépend des propriétés électroniques du chromophore et de la nature de son environnement.

Cette technique possède deux avantages tout à fait intéressants. Elle est tout d'abord très sensible. Grâce au photomultiplicateur qu'elle emploie pour détecter les photons émis, elle est capable d'atteindre des seuils de sensibilité inférieurs à la picomole, comparables aux méthodes utilisant des radioisotopes. D'autre part, comme le phénomène de réémission est relativement lent, les états excités du chromophore peuvent entrer en interaction avec les molécules environnantes avant que le photon soit réémis. Ainsi, de faibles changements environnementaux (polarité, charge) autour du chromophore se traduiront par des variations importantes de ces paramètres de fluorescence (I_F et $\lambda_{em\ max}$).

V Equilibres de fixation et cinétiques enzymatiques

V.1 Détermination des constantes d'équilibre (K_d) du FMN pour ActVA et ActVB : expériences de fixation à l'équilibre

Toutes les expériences de fixation à l'équilibre ont été réalisées à 18°C.

V.1.A Détermination des constantes d'équilibre par spectroscopie UV-visible

En ce qui concerne les expériences effectuées en aérobiose, les spectres UV-visible ont été enregistrés par un spectrophotomètre à barrette de diode Hewlett-Packard 8453. Pour les expériences réalisées en anaérobiose, nous avons utilisé un spectrophotomètre Uvikon XL relié à une cuve, placée en boîte à gants, par un système de fibres optiques (Photonics system).

Les valeurs de K_d du FMN_{ox} pour ActVA et ActVB ont été déterminées en suivant la variation du signal UV-visible du FMN, à des longueurs d'ondes déterminées (440 et 480 nm respectivement), en fonction de la quantité de protéine ajoutée et en utilisant l'équation 1.

$$[FMN_{lié}] = ([FMN_{tot}] \times [protéine_{libre}]) / (K_d + [protéine_{libre}])$$

Equation 1

En faisant l'hypothèse que ActVA et ActVB contiennent 1 site de fixation du FMN par monomère, la concentration de FMN lié a pu être calculée à partir des concentrations totales de FMN en utilisant l'équations 2.

$$[FMN_{lié}] = [(A_x - A_o) / (A_f - A_o)] \times [FMN_{tot}]$$

Equation 2

où A_0 est la valeur d'absorbance initiale, A_f la valeur d'absorbance en fin de titration et A_x la valeur d'absorbance après l'ajout d'une quantité donnée de protéine.

A partir de la même hypothèse, la concentration de protéine libre peut être aussi calculée en fonction de la concentration totale de protéine en utilisant l'équation 3.

$$[\text{protéine}_{\text{libre}}] = [\text{protéine}_{\text{tot}}] - [\text{FMN}_{\text{lié}}]$$

Equation 3

La variation de la concentration de FMN lié en fonction de celle du FMN libre est ajustée avec l'équation 1 en utilisant l'algorithme de Levenberg-Marquardt avec le logiciel KaleidagraphTM.

V.1.B Détermination des constantes d'équilibre par spectroscopie de fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés avec un spectrofluorimètre Jasco FP 6500 à 18°C dans une cuve de 1 cm de trajet optique, sous agitation, avec une longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) égale à 295 nm et en mesurant le signal de fluorescence de la protéine entre 310 et 420 nm. Les valeurs de K_d du FMN_{ox} et FMN_{red} pour ActVA ont été déterminées en suivant la variation du signal de fluorescence de ActVA en fonction de la quantité de flavine ajoutée au mélange. Le filtre interne provoqué par ce chromophore a été évalué à l'excitation et à l'émission. Les valeurs de fluorescence mesurées ont été corrigées selon la méthode décrite plus bas. De la même manière que pour les expériences de titration effectuées par spectroscopie UV-visible, les valeurs de K_d ont été déterminées à l'aide des équations 4, 5 et 6.

$$[\text{ActVA}_{\text{liée}}] = ([\text{ActVA}_{\text{tot}}] \times [\text{FMN}_{\text{libre}}]) / (K_d + [\text{FMN}_{\text{libre}}])$$

Equation 4

En faisant l'hypothèse que ActVA contient 1 site de fixation de FMN par monomère, la concentration de ActVA liée a pu être calculée à partir des concentrations totales de ActVA et de FMN.

$[\text{ActVA}_{\text{liée}}] = [(F_o - F_x) / (F_o - F_f)] \times [\text{ActVA}_{\text{tot}}]$	Equation 5
---	------------

où F_o est la valeur de fluorescence initiale de ActVA, F_f la valeur de fluorescence de ActVA totalement saturée par le FMN et F_x la valeur de fluorescence après l'ajout d'une quantité donnée de FMN oxydé ou réduit.

A partir de la même hypothèse, la concentration de FMN libre peut être aussi calculée.

$[\text{FMN}_{\text{libre}}] = [\text{FMN}_{\text{tot}}] - [\text{ActVA}_{\text{liée}}]$	Equation 6
--	------------

La variation de la concentration de ActVA liée, en fonction de celle du FMN libre est ajustée avec l'équation 4 en utilisant l'algorithme de Levenberg-Marquardt avec le logiciel KaleidagraphTM.

V.1.B.a Notion de filtre interne

Prenons l'exemple d'un mélange de deux molécules qui n'interagissent pas entre elles :

- la première, A, est un chromophore fluorescent qui absorbe à 295 nm et réémet aux alentours de 340 nm

- la deuxième, B, est un chromophore non fluorescent qui possède un spectre d'absorption étendu du domaine ultraviolet au visible.

Dans le but d'analyser la fluorescence de A, une lumière monochromatique d'une longueur d'onde de 295 nm est envoyée sur la solution et le signal de fluorescence est mesuré à 90° entre 310 et 420 nm. Lorsque cette expérience est réalisée en présence et en absence de B, les signaux de fluorescence obtenus sont différents : B provoque *un filtre interne*. Le résultat spectral de ce phénomène peut être illustré par la figure 2 ci-dessous.

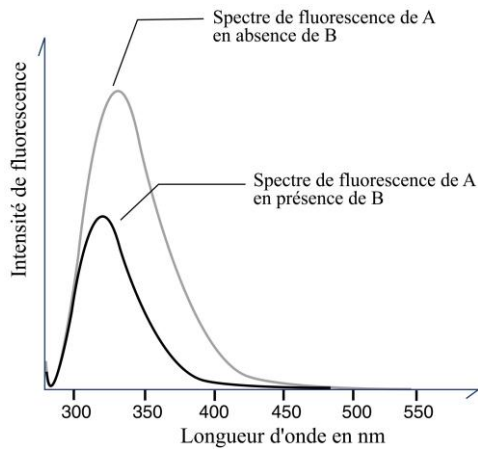


Figure 2. Spectres de fluorescence de l'espèce A en présence et en absence de l'espèce B.

Bien qu'il n'interagisse pas avec A, B fait varier l'intensité maximum du spectre de fluorescence de A ainsi que sa λ_{max} .

Pour comprendre ce phénomène, il suffit de superposer le spectre de fluorescence de A au spectre d'absorbance de B (figure 3).

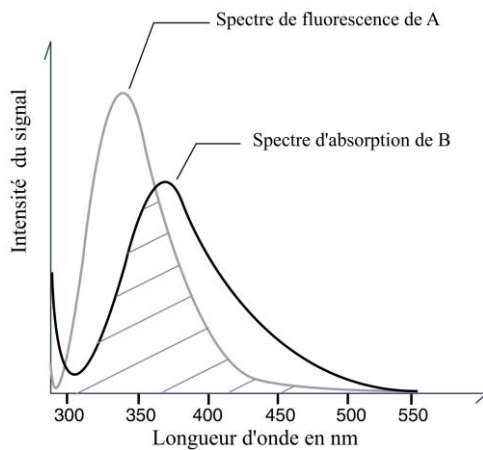


Figure 3. Superposition du spectre de fluorescence de A avec le spectre d'absorbance de B. La zone hachurée correspond à la fraction de lumière réabsorbée par B lors du processus de fluorescence.

La variation de l'intensité de fluorescence et du λ_{max} est provoquée par deux phénomènes :

- B absorbe à 295 nm, la longueur d'onde d'excitation de A. Il diminue donc la quantité de lumière perçue par A.

- B absorbe dans la zone de réémission de A (zone hachurée). Il absorbe une partie de la fluorescence réémise par A et diminue ainsi la quantité de lumière perçue par le photomultiplicateur.

B provoque donc *un filtre interne* non seulement à l'excitation mais aussi à l'émission.

Dans notre cas, le FMN absorbe à la longueur d'excitation de ActVA (295 nm) mais aussi dans sa zone de réémission (300 - 400 nm). Il est donc nécessaire de corriger nos valeurs expérimentales afin d'étudier uniquement les variations de fluorescence intrinsèques à ActVA lorsqu'elle fixe le FMN.

V.1.B.b Correction du filtre interne

Considérons une molécule de tryptophane en solution dans de l'eau pure située au centre d'une cuve carrée de 1 cm de côté (figure 4).

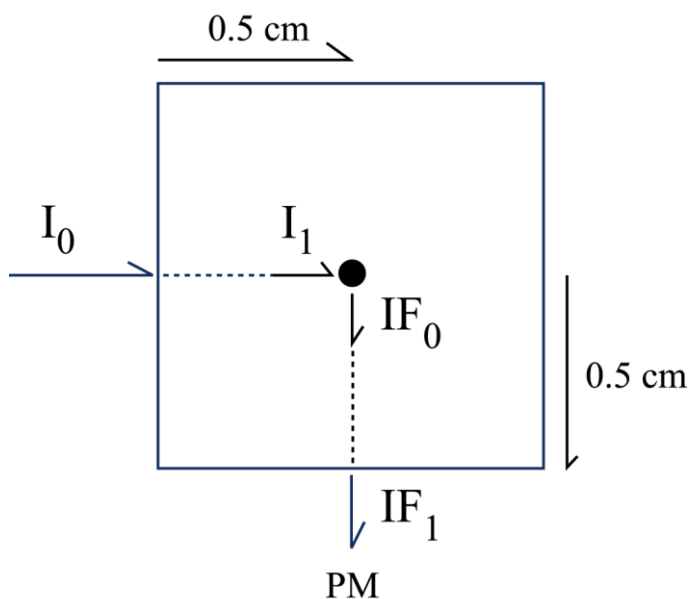


Figure 4. Représentation schématique de la trajectoire du faisceau lumineux au sein d'une cuve de 1 cm de côté, située dans un spectrofluorimètre. Le point noir central matérialise une molécule de tryptophane ; I_0 , I_1 , IF_0 , IF_1 représentent respectivement l'intensité de la source lumineuse initiale, l'intensité perçue par le tryptophane, l'intensité de fluorescence réémise par le tryptophane et l'intensité de fluorescence perçue par le photomultiplicateur (PM).

Cette solution est éclairée par une lumière monochromatique d'une longueur d'onde de 295 nm et d'une intensité I_0 . Le signal de fluorescence est récupéré à 90° du faisceau incident et

quantifié à l'aide d'un photomultiplicateur (PM). Comme nous l'avons vu plus haut, la fluorescence théorique à 340 nm, IF_{th} est telle que :

$$IF_{th} = \phi \times I_0 \quad \text{Equation 7}$$

Or en présence d'un chromophore tel que le FMN qui absorbe une partie de la lumière d'excitation et d'émission (à 295 et 340 nm respectivement), l'intensité de fluorescence observée par le photomultiplicateur n'est plus IF_{th} mais IF_1 .

Or d'après la loi de Beer-Lambert, on a :

$$\text{Log } I_0 / I_l = A_{ex} \quad \text{Equation 8}$$

A_{ex} représente l'absorption de la lumière d'excitation à 295 nm par le FMN ;

$A_{ex} = \epsilon_{FMN \ 295 \text{ nm}} \times [FMN] \times l$ avec $l = 0,5 \text{ cm}$.

Ainsi, la lumière réellement perçue par le tryptophane s'écrit :

$$I_l = I_0 \times 10^{-A_{ex}} \quad \text{Equation 9}$$

L'intensité de lumière réémise par ce dernier (IF_0), est telle que :

$$IF_0 = \phi \times I_l \quad \text{Equation 10}$$

Cette lumière est absorbée en partie par le FMN et IF_0 devient IF_1 telle que :

$$IF_1 = IF_0 \times 10^{-A_{em}} \quad \text{Equation 11}$$

A_{em} représente l'absorption par le FMN de la lumière émise par le tryptophane à 340 nm ;

$A_{em} = \epsilon_{FMN \ 340 \text{ nm}} \times [FMN] \times l$ avec $l = 0,5 \text{ cm}$.

Les équations 7 et 9, 10 et 11 nous permettent d'obtenir l'équation 12 qui décrit la fluorescence théorique du tryptophane (IF_{th}) en fonction de la valeur de fluorescence mesurée (IF_l) et des paramètres spectroscopiques du FMN ($\epsilon_{FMN\ 295\ nm}$ et $\epsilon_{FMN\ 340\ nm}$) :

$$IF_{th} = IF_l \times 10^{A_{ex}} \times 10^{A_{em}} \quad \text{Equation 12}$$

Comme le filtre interne est dépendant de la distance que parcourt le faisceau lumineux au sein de la solution, ce phénomène n'est pas homogène en tous points de la cuve. Afin de prendre en compte cet effet, la cuvette est divisée en 100 carrés identiques que l'on identifie par des coordonnées x et y (schéma 4).

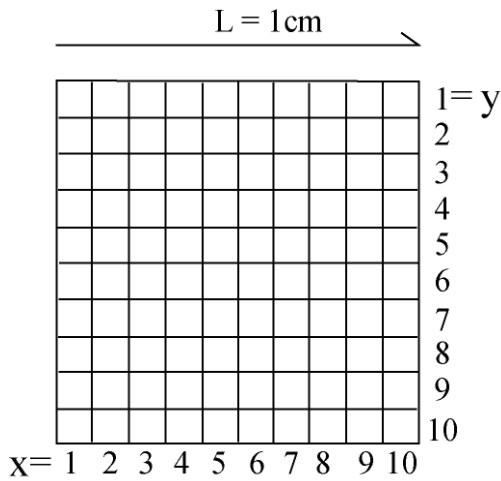


Schéma 4. Division de la cuve fluorimétrique en 100 carrés identiques. Les coordonnées (x et y) de chacun de ces carrés sont indiquées au dessous et à droite de la cuve respectivement.

Les facteurs de filtre interne ($10^{A_{ex}} \times 10^{A_{em}}$) sont calculés pour chacun d'entre eux, additionnés et enfin multipliés par la fluorescence totale observée $IF_{obs\ tot}$. Ce traitement nous permet d'obtenir $IF_{th\ tot}$ (équation 13). Cette valeur correspond rigoureusement à la fluorescence intrinsèque à la protéine ActVA. Elle est utilisée pour déterminer les constantes d'affinité K_d selon la méthode décrite plus haut.

$$IF_{th\ tot} = IF_{obs\ tot} \times \left[\sum_{x=1}^{x=10} \sum_{y=1}^{y=10} 10^{\frac{\epsilon_{ex}[FMN] x L}{10}} \times 10^{\frac{\epsilon_{em}[FMN] y L}{10}} \right] \quad \text{Equation 13}$$

(avec $IF_{obs\ tot} = \sum IF_1$)

V.2 Cinétiques enzymatiques à l'état stationnaire

V.2.A Activité Flavine réductase de ActVB

L'activité flavine réductase de ActVB est déterminée à température ambiante (25°C) en mesurant la diminution de l'absorbance à 340 nm au cours du temps, due à l'oxydation du NADH ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 6,22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Dans les conditions standard, une cuve de 1 cm de trajet optique d'une contenance de 100 μL contient du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 200 μM de NADH et 80 μM de FMN. La réaction est initiée par l'ajout de 0,2 μg de ActVB (155 nM final). Les mesures de vitesse initiale sont réalisées en effectuant une régression linéaire des valeurs de $DO_{340\text{ nm}}$ obtenues au cours du temps lorsque moins de 10 % du NADH total sont consommés. Le coefficient directeur de cette droite représente la vitesse initiale de disparition du NADH. L'activité spécifique de ActVB ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) est obtenue en divisant cette valeur par la quantité de protéine utilisée pour ce test ainsi que par la valeur du coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm.

V.2.B Activité NNM-A réductase de ActVB

L'activité NNM-A Réductase est mesurée par la diminution de l'absorbance à 423 nm due à la réduction de la forme quinone de la NNM-A ($\epsilon_{423\text{ nm}} = 4,0\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), à 18°C et sous atmosphère inerte d'azote. Dans les conditions standard, une cuve de 1 cm de trajet optique d'une contenance de 100 μL contient du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 200 μM de NADH et différentes quantités de NNM-A (0 - 550 μM). La réaction est initiée par l'ajout d'ActVB:FMN_c (50 nM final). Les mesures de vitesse initiale sont réalisées en effectuant une régression linéaire des valeurs de $DO_{423\text{ nm}}$ obtenues au cours du temps lorsque moins de 10 % de la NNM-A totale sont réduits. Le coefficient directeur de cette droite représente la vitesse initiale de disparition du NADH. Les valeurs de vitesses initiales obtenues sont représentées en fonction de la concentration de NNM-A, puis ajustées selon l'équation de Michaelis-Menten $V_i = (V_{\text{max}} \times [\text{NNM-A}]) / (K_m + [\text{NNM-A}])$ avec l'algorithme de Levenberg-Marquardt avec le logiciel KaleidagraphTM.

V.2.C Réaction d'oxydation catalysée par le système ActVA-ActVB

Les réactions d'oxydation catalysées par le système ActVA-ActVB sont réalisées en aérobiose et à 25°C.

i En absence de substrat pyronaphthoquinonique

ActVB (155 nM final) est ajoutée à un mélange de 100 µL contenant 200 µM de NADH, 46 ou 80 µM de FMN, de 0 à 104 µM de ActVA et 20 mM de tampon Tris-HCl pH 7,6. La réaction est suivie par spectroscopie UV-visible.

ii En présence de substrat pyronaphthoquinonique oxydé

ActVB (155 nM final) est ajoutée à un mélange de 100 µL contenant 200 µM de NADH, 4 µM de FMN, 36 µM de substrat pyronaphthoquinonique oxydé, 0 à 180 µM de ActVA et 20 mM de tampon Tris-HCl pH 7,6. La réaction d'hydroxylation est suivie à 520 nm et la masse du produit final est déterminée par HPLC-MS (cf infra). Afin d'hydroxyler la totalité des substrats pyronaphthoquinoniques, des additions successives de 20 nmol de NADH sont réalisées, et le mélange réactionnel est réoxygéné après chaque ajout par une série de 20 aspiration-libération de la solution à l'aide d'un Pipetman^R.

V.3 Cinétiques enzymatiques transitoires

V.3.A Réduction photochimique du FMN et des substrats pyronaphthoquinoniques en anaérobiose

La réduction du FMN et des substrats pyronaphthoquinoniques est effectuée à l'aide de la 5-déazaflavine. L'irradiation de cette dernière en anaérobiose provoque la formation d'une entité très oxydante qui, en présence d'une base telle que l'EDTA, se réduit et forme une espèce radicalaire semiquinonique très réductrice (E'° [5-DAF/5-DAF[•]] = - 650 mV) nommée 5-DAF[•] (Hemmerich et coll, 1977). Cette espèce est en équilibre avec une forme dimérique de 5-DAF[•] stable et inerte d'un point de vue rédox. En présence de lumière, cet équilibre est déplacé en faveur de l'espèce radicalaire capable de transférer 1 à 2 électrons alors qu'à l'inverse, en absence de lumière, la déazaflavine s'accumule sous forme de dimère et le transfert d'électrons est alors impossible.

Classiquement, un stock désoxygéné de 500 µM de FMN (ou de substrat pyronaphthoquinonique) contenant 10 mM d'EDTA et 0,5 µM de déazariboflavine est éclairé sous atmosphère inerte d'azote (boîte à gants) par une lumière blanche (projecteur de diapositive) dont la source est située à environ 3 cm du mélange. La réduction est totale après

un temps inférieur ou égal à 10 min d'illumination.

V.3.B Oxygénation des substrats pyronaphthoquinoniques par le système ActVA-FMNH₂-O₂

Ces réactions s'effectuent sous atmosphère inerte d'azote (boîte à gants) à 18°C.

i Oxygénation des substrats pyronaphthoquinoniques réduits

Un mélange contenant 10 µM de FMNH₂, 10 µM de substrat pyronaphthoquinonique réduit, 50 µM de ActVA et 20 mM de tampon Tris-HCl pH 7,6, est réalisé dans une cuve spectrophotométrique de 100 µL. Cette cuve est ensuite bouchée hermétiquement à l'aide d'un septum et 10 µL d'eau saturée à 1mM en oxygène pur sont ajoutés au mélange rapidement à l'aide d'une seringue Hamilton. La réaction est suivie par spectroscopie UV-visible et la masse du produit final est déterminée par HPLC-MS.

ii Oxygénation des substrats pyronaphthoquinoniques oxydés

Un mélange de 90 µL contenant 10 à 20 µM de FMNH₂, 50 µM de ActVA et 20 mM de tampon Tris-HCl pH 7,6, est réalisé dans une cuve spectrophotométrique de 100 µL. Cette cuve est ensuite bouchée hermétiquement à l'aide d'un septum et 10 µL d'une solution stock de 100 µM de substrats pyronaphthoquinoniques contenant différentes quantités d'oxygène dissout (de 0,280 à 1 mM) sont ajoutés à l'aide d'une seringue Hamilton. Pour préparer ces solutions stocks, différentes quantités d'eau saturée en oxygène pur (1 mM) sont ajoutées dans un volume total de 100 µL à une solution de substrats pyronaphthoquinoniques (concentration finale 100 µM) contenue dans un microtube de 150 µL bouché par un septum. Ce mélange est vortexé 2 à 3 fois durant 30 s puis utilisé pour les expériences d'oxydation après un temps inférieur ou égal à 10 min.

V.4 Détection et identification des produits de réaction

V.4.A HPLC

Les analyses HPLC ont été réalisées à l'aide d'un système de chromatographie Agilent 1100 couplé à un spectrophotomètre UV-visible équipé d'un détecteur à barrettes de diode. Le mélange réactionnel à analyser (100 µL) est dilué d'un facteur 2 dans une solution d'eau contenant 0,1 % TFA puis chargé à 1 mL/min sur une colonne de silice en phase inverse (C18, Interchim) préalablement équilibrée par un mélange de 65 % d'eau ultra pure acide (0,1

% TFA) et 35 % d'acétonitrile acide (0,1 % TFA). L'élution est réalisée grâce à un gradient linéaire de 35 à 100 % d'acétonitrile acide à un débit de 1 mL/min pendant 10 min. Le substrat et le produit hydroxylé sont détectés à 423 et 520 nm et élués après 7,3 et 7,8 min respectivement. Ce protocole permet d'obtenir une séparation efficace et reproductible de ces deux composés, cependant, il semble préférable qu'il soit effectué à pH neutre plutôt qu'à pH acide, afin d'éviter toute apparition de précipités protéiques.

V.4.B HPLC-MS : mode MRM

Les analyses HPLC-MS ont été réalisées en mode négatif à l'aide d'un système de chromatographie Agilent 1100 couplé à un spectromètre de masse API 3000 (PerkinElmer Life Sciences) équipé de trois détecteurs quadripolaires disposés en série. Le premier quadripôle permet de sélectionner un ion de masse donnée. Cet ion entre en collision avec un flux d'argon dans la « cellule de collision ». Il est alors fragmenté puis analysé dans le troisième quadripôle. Cette méthode nommée SRM (Selected Reaction Monitoring) permet de sélectionner spécifiquement une molécule d'intérêt de masse connue, présente dans un mélange, et d'en analyser quantitativement le profil de fragmentation. Comme la durée de cette analyse est courte (650 ms suffisent), il est aussi possible de réaliser cette étude sur plusieurs composés simultanément : c'est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Ce dernier a été employé dans nos expériences.

20 µL de mélange réactionnel sont chargés à 200 µL/min sur une colonne de silice en phase inverse (C18, Uptisphere, Interchim) préalablement équilibrée par un mélange de 65 % d'eau ultra pure et 35 % d'acétonitrile contenant tout deux 5 mM de formiate d'ammonium. L'élution est réalisée grâce à un gradient linéaire de 35 à 100 % d'acétonitrile, à un débit de 200 µL/min, pendant 10 min.

En sortie de colonne, l'éluat est nébulisé par électrospray. Les trois masses correspondantes aux substrats (DHK, NNM-A ou NNM-D), aux produits hydroxylés (DHK-OH, NNM-A-OH, ou NNM-D-OH) et à l'actinorhodine sont sélectionnées puis fragmentées dans le deuxième quadripôle. Les fragments ainsi obtenus (une fonction acide carboxylique est perdue : - 44 Da) sont analysés un par un toutes les 650 ms.

Bibliographie

A

Anderson, R. F. (1982) *Flavins and Flavoproteins*, 278-283. *Flavin-oxygen complexe formed on the reaction of superoxyde and flavosemiquinone radicals*

B

Barman, B. G., and Tollin, G. (1972) *Biochemistry* **11**, 4755-4759. *Flavine-protein interactions in flavoenzymes. Thermodynamics and kinetics of reduction of Azotobacter flavodoxin*

Becker, D., Schrader, T., and Andreessen, J. R. (1997) *Eur J Biochem* **249**, 739-747. *Two-component flavin-dependent pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from Rhodococcus sp*

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Hopwood, D. A. (2002) *Nature* **417**, 141-147. *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2)*

Blanc, V., Lagneaux, D., Didier, P., Gil, P., Lacroix, P., and Crouzet, J. (1995) *J Bacteriol* **177**, 5206-5214. *Cloning and analysis of structural genes from Streptomyces pristinaespiralis encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin IIB to pristinamycin IIA (PIIA): PIIA synthase and NADH:riboflavin 5'-phosphate oxidoreductase*

Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* **72**, 248-254. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*

Brimble, M., Duncalf, L. J., and Phytian, S. J. (1997) *J. Chem. Soc Perkin Trans 1.*, 1399-1403. *Synthesis of Monomeric Unit of actinorhodin*

Bruice, T. C. (1984) *Israel Journal of Chemistry.*, 24-54. *Oxygen-flavin chemistry*

Bucheli-Witschel, M., and Egli, T. (2001) *FEMS Microbiol Rev* **25**, 69-106. *Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids*

Bystrykh, L. V., Fernandez-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A., and Dijkhuizen, L. (1996) *J Bacteriol* **178**, 2238-2244. *Production of actinorhodin-related "blue pigments" by Streptomyces coelicolor A3(2)*

C

Caballero, J. L., Martinez, E., Malpartida, F., and Hopwood, D. A. (1991) *Mol Gen Genet* **230**, 401-412. *Organisation and functions of the actVA region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of Streptomyces coelicolor*

Carrillo, N., and Ceccarelli, E. A. (2003) *Eur J Biochem* **270**, 1900-1915. *Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism*

Chikuba, K., Yubisui, T., Shirabe, K., and Takeshita, M. (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 1170-1176. *Cloning and nucleotide sequence of a cDNA of the human erythrocyte NADPH-flavin reductase*

Chiu, H. J., Johnson, E., Schroder, I., and Rees, D. C. (2001) *Structure (Camb)* **9**, 311-319. *Crystal structures of a novel ferric reductase from the hyperthermophilic archaeon Archaeoglobus fulgidus and its complex with NADP⁺*

Chlumsky, L. J., Sturgess, A. W., Nieves, E., and Jorns, M. S. (1998) *Biochemistry* **37**, 2089-2095. *Identification of the covalent flavin attachment site in sarcosine oxidase*

Cole, S. P., Rudd, B. A., Hopwood, D. A., Chang, C. J., and Floss, H. G. (1987) *J Antibiot (Tokyo)* **40**, 340-347. *Biosynthesis of the antibiotic actinorhodin. Analysis of blocked mutants of Streptomyces coelicolor*

Croteau, N., and Vrielink, A. (1996) *J Struct Biol* **116**, 317-319. *Crystallization and preliminary X-ray analysis of cholesterol oxidase from Brevibacterium sterolicum containing covalently bound FAD*

D

Duane, W., and Hastings, J. W. (1975) *Mol Cell Biochem* **6**, 53-64. *Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria*

Duffner, F. M., Kirchner, U., Bauer, M. P., and Muller, R. (2000) *Gene* **256**, 215-221. *Phenol/cresol degradation by the thermophilic Bacillus thermoglucosidasius A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway*

Duffner, F. M., and Muller, R. (1998) *FEMS Microbiol Lett* **161**, 37-45. *A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic Bacillus thermoleovorans strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes*

E

Edmondson, D. E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., and Hubalek, F. (2004) *Curr Med Chem* **11**, 1983-1993. *Structure and mechanism of monoamine oxidase*

Egli, T., Bally, M., and Uetz, T. (1990) *Biodegradation* **1**, 121-132. *Microbial degradation of chelating agents used in detergents with special reference to nitrilotriacetic acid (NTA)*

Entsch, B., and Ballou, D. P. (1989) *Biochim Biophys Acta* **999**, 313-322. *Purification, properties, and oxygen reactivity of p-hydroxybenzoate hydroxylase from Pseudomonas aeruginosa*

Entsch, B., Ballou, D. P., and Massey, V. (1976) *J Biol Chem* **251**, 2550-2563. *Flavin-oxygen derivatives involved in hydroxylation by p-hydroxybenzoate hydroxylase*

Entsch, B., Cole, L. J., and Ballou, D. P. (2005) *Arch Biochem Biophys* **433**, 297-311. *Protein dynamics and electrostatics in the function of p-hydroxybenzoate hydroxylase*

Eschenbrenner, M., Coves, J., and Fontecave, M. (1995) *FEBS Lett* **374**, 82-84. *NADPH-sulfite reductase flavoprotein from Escherichia coli: contribution to the flavin content and subunit interaction*

F

Fernandez-Moreno, M. A., Martinez, E., Boto, L., Hopwood, D. A., and Malpartida, F. (1992) *J Biol Chem* **267**, 19278-19290. *Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of Streptomyces coelicolor A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin*

Fieschi, F., Niviere, V., Frier, C., Decout, J. L., and Fontecave, M. (1995) *J Biol Chem* **270**, 30392-30400. *The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from Escherichia coli*

Filisetti, L. (2004) *Flavines Réductases et réactions d'hydroxylation; Thèse*

Filisetti, L., Fontecave, M., and Niviere, V. (2003) *J Biol Chem* **278**, 296-303. *Mechanism and substrate specificity of the flavin reductase ActVB from Streptomyces coelicolor*

Filisetti, L., Valton, J., Fontecave, M., and Niviere, V. (2005) *FEBS Lett* **579**, 2817-2820. *The flavin reductase ActVB from Streptomyces coelicolor: characterization of the electron transferase activity of the flavoprotein form*

Fontecave, M., Coves, J., and Pierre, J. L. (1994) *Biometals* **7**, 3-8. *Ferric reductases or flavin reductases?*

Fontecave, M., Eliasson, R., and Reichard, P. (1987) *J Biol Chem* **262**, 12325-12331. *NAD(P)H:flavin oxidoreductase of Escherichia coli. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase*

Fox, S., and Karlin, K. D. (1995) *Active oxygen in biochemistry* **3**, 188-231. *Dioxygen reactivity in copper proteins and complexes*

Frederick, K. K., Ballou, D. P., and Palfey, B. A. (2001) *Biochemistry* **40**, 3891-3899. *Protein dynamics control proton transfers to the substrate on the His72Asn mutant of p-hydroxybenzoate hydroxylase*

G

Gadda, G., and Fitzpatrick, P. F. (1998) *Biochemistry* **37**, 6154-6164. *Biochemical and physical characterization of the active FAD-containing form of nitroalkane oxidase from Fusarium oxysporum*

Galan, B., Diaz, E., Prieto, M. A., and Garcia, J. L. (2000) *J Bacteriol* **182**, 627-636. *Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of Escherichia coli W: a prototype of a new Flavin:NAD(P)H reductase subfamily*

Gaudu, P., Touati, D., Niviere, V., and Fontecave, M. (1994) *J Biol Chem* **269**, 8182-8188. *The NAD(P)H:flavin oxidoreductase from Escherichia coli as a source of superoxide radicals*

Ghisla, S., and Massey, V. (1989) *Eur J Biochem* **181**, 1-17. *Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions*

Ghisla, S., and Thorpe, C. (2004) *Eur J Biochem* **271**, 494-508. *Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview*

Gomez-Moreno, C., Choy, M., and Edmondson, D. E. (1979) *J Biol Chem* **254**, 7630-7635. *Purification and properties of the bacterial flavoprotein: thiamin dehydrogenase*

Gray, K. A., Pogrebinsky, O. S., Mrachko, G. T., Xi, L., Monticello, D. J., and Squires, C. H. (1996) *Nat Biotechnol* **14**, 1705-1709. *Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels*

H

Hallam, S. E., Malpartida, F., and Hopwood, D. A. (1988) *Gene* **74**, 305-320. *Nucleotide sequence, transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in Streptomyces coelicolor*

Hamilton, G. A. (1974) *Academic press, New York*, 405-451. *Chemical model for oxygenases, in molecular mechanisms of oxygen activation*

Hastings, J. W., and Balny, C. (1975) *J Biol Chem* **250**, 7288-7293. *The oxygenated bacterial luciferase-flavin intermediate. Reaction products via the light and dark pathways*

Hefti, M. H., Milder, F. J., Boeren, S., Vervoort, J., and van Berkel, W. J. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1619**, 139-143. *A His-tag based immobilization method for the preparation and reconstitution of apoflavoproteins*

Hemmerich, P., and Massey, V. (1977) *FEBS Lett* **84**, 5-21. *Flavin and 5-deazaflavin: a chemical evaluation of 'modified' flavoproteins with respect to the mechanisms of redox biocatalysis*

Hopwood, D. A. (1997) *Chem Rev* **97**, 2465-2498. *Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases*

Hubner, A., Danganan, C. E., Xun, L., Chakrabarty, A. M., and Hendrickson, W. (1998) *Appl Environ Microbiol* **64**, 2086-2093. *Genes for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism in Burkholderia cepacia AC1100: characterization of the tftC and tftD genes and locations of the tft operons on multiple replicons*

Husain, M., and Massey, V. (1979) *J Biol Chem* **254**, 6657-6666. *Kinetic studies on the reaction of p-hydroxybenzoate hydroxylase. Agreement of steady state and rapid reaction data*

I

Ichinose, K., Bedford, D. J., Tornus, D., Bechthold, A., Bibb, M. J., Reville, W. P., Floss, H. G., and Hopwood, D. A. (1998) *Chem Biol* **5**, 647-659. *The granaticin biosynthetic gene cluster of Streptomyces violaceoruber Tu22: sequence analysis and expression in a heterologous host*

Ichinose, K., Surti, C., Taguchi, T., Malpartida, F., Booker-Milburn, K. I., Stephenson, G. R., Ebizuka, Y., and Hopwood, D. A. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* **9**, 395-400. *Proof that the ACTVI genetic region of Streptomyces coelicolor A3(2) is involved in stereospecific pyran ring formation in the biosynthesis of actinorhodin*

Imai, H., Suzuki, K., Kadota, S., Iwanami, M., and Saito, T. (1989) *J Antibiot (Tokyo)* **42**, 1186-1188. *Production of enantiomer of nanaomycin A by Nocardia*

J

Jablonski, E., and DeLuca, M. (1977) *Biochemistry* **16**, 2932-2936. *Purification and properties of the NADH and NADPH specific FMN oxidoreductases from Beneckea harveyi*

Jeffers, C. E., Nichols, J. C., and Tu, S. C. (2003) *Biochemistry* **42**, 529-534. *Complex formation between Vibrio harveyi luciferase and monomeric NADPH:FMN oxidoreductase*

Jeffers, C. E., and Tu, S. C. (2001) *Biochemistry* **40**, 1749-1754. *Differential transfers of reduced flavin cofactor and product by bacterial flavin reductase to luciferase*

K

Kendrew, S. G., Harding, S. E., Hopwood, D. A., and Marsh, E. N. (1995) *J Biol Chem* **270**, 17339-17343. *Identification of a flavin:NADH oxidoreductase involved in the biosynthesis of actinorhodin. Purification and characterization of the recombinant enzyme*

Khan, M. S., and Khan, Z. H. (2005) *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **61**, 777-790. *Ab initio and semiempirical study of structure and electronic spectra of hydroxy substituted naphthoquinones*

Kim, J., Fuller, J. H., Kuusk, V., Cunane, L., Chen, Z. W., Mathews, F. S., and McIntire, W. S. (1995) *J Biol Chem* **270**, 31202-31209. *The cytochrome subunit is necessary for covalent FAD attachment to the flavoprotein subunit of p-cresol methylhydroxylase*

Kim, J. J., and Wu, J. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6677-6681. *Structure of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria at 3-A resolution*

Kirchner, U., Westphal, A. H., Muller, R., and van Berkel, W. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 47545-47553. *Phenol hydroxylase from Bacillus thermoglucosidasius A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD*

Kiyohara, H., Hatta, T., Ogawa, Y., Kakuda, T., Yokoyama, H., and Takizawa, N. (1992) *Appl Environ Microbiol* **58**, 1276-1283. *Isolation of Pseudomonas pickettii strains that degrade 2,4,6-trichlorophenol and their dechlorination of chlorophenols*

Knobel, H. R., Egli, T., and van der Meer, J. R. (1996) *J Bacteriol* **178**, 6123-6132. *Cloning and characterization of the genes encoding nitrilotriacetate monooxygenase of Chelatobacter heintzii ATCC 29600*

Konishi, J., Ishii, Y., Onaka, T., and Maruhashi, K. (2002) *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 128-133. *Purification and characterization of the monooxygenase catalyzing sulfur-atom specific oxidation of dibenzothiophene and benzo thiophene from the thermophilic bacterium Paenibacillus sp. strain A11-2*

L

Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., and White, S. H. (2000) *Anal Biochem* **285**, 235-245. *How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?*

Laemmli, U. K., and Favre, M. (1973) *J Mol Biol* **80**, 575-599. *Maturation of head of bacteriophage T4. DNA packaging events*

Lei, B., Liu, M., Huang, S., and Tu, S. C. (1994) *J Bacteriol* **176**, 3552-3558. *Vibrio harveyi NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme*

Lei, B., and Tu, S. C. (1996) *J Bacteriol* **178**, 5699-5705. *Gene overexpression, purification, and identification of a desulfurization enzyme from Rhodococcus sp. strain IGTS8 as a sulfide/sulfoxide monooxygenase*

Lei, B., and Tu, S. C. (1998) *Biochemistry* **37**, 14623-14629. *Mechanism of reduced flavin transfer from Vibrio harveyi NADPH-FMN oxidoreductase to luciferase*

Louie, T. M., Xie, X. S., and Xun, L. (2003) *Biochemistry* **42**, 7509-7517. *Coordinated production and utilization of FADH₂ by NAD(P)H-flavin oxidoreductase and 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase*

M

Macheroux, P., Petersen, J., Bornemann, S., Lowe, D. J., and Thorneley, R. N. (1996) *Biochemistry* **35**, 1643-1652. *Binding of the oxidized, reduced, and radical flavin species to chorismate synthase. An investigation by spectrophotometry, fluorimetry, and electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy*

Martin, G., Dijols, S., Capeillere-Blandin, C., and Artaud, I. (1999) *Eur J Biochem* **261**, 533-539. *Hydroxylation reaction catalyzed by the Burkholderia cepacia AC1100 bacterial strain. Involvement of the chlorophenol-4-monooxygenase*

Massey, V. (1994) *J Biol Chem* **269**, 22459-22462. *Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins*

Massey, V., Matthews, R. G., Foust, G. P., Howell, L. G., Williams, C. H. J., Zanetti, G., and Ronchi, S. (1970) *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York., 393-410. *A New Intermediate in TPNH-linked Flavoproteins*

Massey, V., and Palmer, G. (1966) *Biochemistry* **5**, 3181-3189. *On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones*

Matsubara, T., Ohshiro, T., Nishina, Y., and Izumi, Y. (2001) *Appl Environ Microbiol* **67**, 1179-1184. *Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothiophene desulfurization by Rhodococcus erythropolis D-1*

McCormick, D. B. (1975) *Riboflavin*, 153-198. *Metabolism of riboflavin*

Meighen, E. A. (1991) *Microbiol Rev* **55**, 123-142. *Molecular biology of bacterial bioluminescence*

Muller, F. (1987) *Free Radic Biol Med* **3**, 215-230. *Flavin radicals: chemistry and biochemistry*

Murataliev, M. B., Feyereisen, R., and Walker, F. A. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1698**, 1-26. *Electron transfer by diflavin reductases*

N

Nelson, M. J., and Seitz, S. P. (1995) *Active oxygen in biochemistry* **3**, 276-312. *The mechanism of lipooxygenases*

Niviere, V., Vanoni, M. A., Zanetti, G., and Fontecave, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 11879-11887. *Reaction of the NAD(P)H:flavin oxidoreductase from Escherichia coli with NADPH and riboflavin: identification of intermediates*

O

Omura, S., Tanaka, H., Okada, H., and Marumo, H. (1976) *J Chem. Soc., Chem Commun.*, 320-321. *Isolation and structure of nanaomycin D, an enantiomer of the antibiotic kalafungin*

Ortiz-Maldonado, M., Ballou, D. P., and Massey, V. (2001) *Biochemistry* **40**, 1091-1101. *A rate-limiting conformational change of the flavin in p-hydroxybenzoate hydroxylase is necessary for ligand exchange and catalysis: studies with 8-mercapto- and 8-hydroxy-flavins*

Ortiz-Maldonado, M., Entsch, B., and Ballou, D. P. (2003) *Biochemistry* **42**, 11234-11242. *Conformational changes combined with charge-transfer interactions are essential for reduction in catalysis by p-hydroxybenzoate hydroxylase*

Ortiz-Maldonado, M., Entsch, B., and Ballou, D. P. (2004) *Biochemistry* **43**, 15246-15257. *Oxygen reactions in p-hydroxybenzoate hydroxylase utilize the H-bond network during catalysis*

P

Palfey, B. A., Ballou, D. P., and Massey, V. (1997) *Biochemistry* **36**, 15713-15723. *Flavin conformational changes in the catalytic cycle of p-hydroxybenzoate hydroxylase substituted with 6-azido- and 6-aminoflavin adenine dinucleotide*

Palfey, B. A., Ballou, D. P., and V., M. (1995) *Active oxygen in biochemistry* **3**, 37-83. *Oxygen activation by flavins and pterins*

Palfey, B. A., Basu, R., Frederick, K. K., Entsch, B., and Ballou, D. P. (2002) *Biochemistry* **41**, 8438-8446. *Role of protein flexibility in the catalytic cycle of p-hydroxybenzoate hydroxylase elucidated by the Pro293Ser mutant*

Prieto, M. A., and Garcia, J. L. (1994) *J Biol Chem* **269**, 22823-22829. *Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of Escherichia coli. A two-protein component enzyme*

Q

Quandt, K. S., and Hultquist, D. E. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9322-9326. *Flavin reductase: sequence of cDNA from bovine liver and tissue distribution*

Que, L. (1995) *Active oxygen in biochemistry* **3**, 232-275. *Oxygen activation at Nonheme iron center*

R

Rudd, B. A., and Hopwood, D. A. (1979) *J Gen Microbiol* **114**, 35-43. *Genetics of actinorhodin biosynthesis by Streptomyces coelicolor A3(2)*

S

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*

Schreuder, H. A., Hol, W. G., and Drenth, J. (1990) *Biochemistry* **29**, 3101-3108. *Analysis of the active site of the flavoprotein p-hydroxybenzoate hydroxylase and some ideas with respect to its reaction mechanism*

Schreuder, H. A., Mattevi, A., Obmolova, G., Kalk, K. H., Hol, W. G., van der Bolt, F. J., and van Berkel, W. J. (1994) *Biochemistry* **33**, 10161-10170. *Crystal structures of wild-type p-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with 4-aminobenzoate, 2,4-dihydroxybenzoate, and 2-hydroxy-4-aminobenzoate and of the Tyr222Ala mutant complexed with 2-hydroxy-4-aminobenzoate. Evidence for a proton channel and a new binding mode of the flavin ring*

Setif, P. (2001) *Biochim Biophys Acta* **1507**, 161-179. *Ferredoxin and flavodoxin reduction by photosystem I*

Spyrou, G., Haggard-Ljungquist, E., Krook, M., Jornvall, H., Nilsson, E., and Reichard, P. (1991) *J Bacteriol* **173**, 3673-3679. *Characterization of the flavin reductase gene (fre) of Escherichia coli and construction of a plasmid for overproduction of the enzyme*

Sucharitakul, J., Chaiyen, P., Entsch, B., and Ballou, D. P. (2005) *Biochemistry* **44**, 10434-10442. *The Reductase of p-Hydroxyphenylacetate 3-Hydroxylase from Acinetobacter baumannii Requires p-Hydroxyphenylacetate for Effective Catalysis*

Sucharitakul, J., Chaiyen, P., Entsch, B., and Ballou, D. P. (2005) Flavins and Flavoproteins Symposium, *Oxygenation Reaction of the Oxygenase Component of p-hydroxyphenylacetate hydroxylase from Acinetobacter baumannii*

T

Tabor, S., and Richardson, C. C. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1074-1078. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes

Taguchi, T., Itou, K., Ebizuka, Y., Malpartida, F., Hopwood, D. A., Surti, C. M., Booker-Milburn, K. I., Stephenson, G. R., and Ichinose, K. (2000) *J Antibiot (Tokyo)* **53**, 144-152. Chemical characterisation of disruptants of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) actVI genes involved in actinorhodin biosynthesis

Tanaka, H., Koyama, Y., Nagai, T., Marumo, H., and Omura, S. (1975) *J Antibiot (Tokyo)* **28**, 868-875. Nanomycins, new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. II. Structure and biosynthesis

Tanaka, H., Minami-Kakinuma, S., and Omura, S. (1982) *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 1565-1570. Biosynthesis of nanaomycin. III. Nanaomycin A formation from nanaomycin D by nanaomycin D reductase via a hydroquinone

Tang, C. K., Jeffers, C. E., Nichols, J. C., and Tu, S. C. (2001) *Arch Biochem Biophys* **392**, 110-116. Flavin specificity and subunit interaction of *Vibrio fischeri* general NAD(P)H-flavin oxidoreductase FRG/FRase I

Tatsuta, K., Akimoto, K., Annaka, M., Ohno, Y., and Kinoshita, M. (1985) *J Antibiot (Tokyo)* **38**, 680-682. Enantiodivergent total syntheses of (-)-nanaomycin D and its enantiomer, (+)-kalafungin

Taube, H. (1965) *J Gen Physiol* **49**, Suppl:29-52. Mechanisms of oxidation with oxygen

Topsoe, H., Clausen, B. S., and Massoth, F. E. (1996) Springer Verlag, Berlin Hydrotreating Catalysis

Traylor, T. G., and Traylor, P. S. (1995) *Active oxygen in biochemistry* **3**, 84-187. Reactions of dioxygen and its reduced forms with heme proteins and model porphyrin complexes

W

Witschel, M., Nagel, S., and Egli, T. (1997) *J Bacteriol* **179**, 6937-6943. Identification and characterization of the two-enzyme system catalyzing oxidation of EDTA in the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103

X

Xu, Y., Mortimer, M. W., Fisher, T. S., Kahn, M. L., Brockman, F. J., and Xun, L. (1997) *J Bacteriol* **179**, 1112-1116. Cloning, sequencing, and analysis of a gene cluster from

Chelatobacter heintzii ATCC 29600 encoding nitrilotriacetate monooxygenase and NADH:flavin mononucleotide oxidoreductase

Xun, L. (1996) *J Bacteriol* **178**, 2645-2649. Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100

Xun, L., and Sandvik, E. R. (2000) *Appl Environ Microbiol* **66**, 481-486. Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (*HpaB*) of *Escherichia coli* as a reduced flavin adenine dinucleotide-utilizing monooxygenase

Z

Zhao, B., Guengerich, F. P., Bellamine, A., Lamb, D. C., Izumikawa, M., Lei, L., Podust, L. M., Sundaramoorthy, M., Kalaitzis, J. A., Reddy, L. M., Kelly, S. L., Moore, B. S., Stec, D., Voehler, M., Falck, J. R., Shimada, T., and Waterman, M. R. (2005) *J Biol Chem* **280**, 11599-11607. Binding of two flavin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) cytochrome P450 158A2